



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES EM BUCHA VEGETAL: PREPARAÇÃO DE
ÉSTERES DE AROMA**

MANUELLA MIRANDA ALVES

Florianópolis
Novembro/2015

Manuella Miranda Alves

**IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES EM BUCHA VEGETAL: PREPARAÇÃO DE
ÉSTERES DE AROMA**

Relatório apresentado ao Departamento de Química
da Universidade Federal de Santa Catarina,
como requisito parcial da disciplina de
Estágio Supervisionado II (QMC 5512)

Orientadora: Maria da Graça Nascimento
Co-orientadora: Jaqueline Maria Ramos da Silva

Florianópolis

11/2015

Manuella Miranda Alves

**IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES EM BUCHA VEGETAL: PREPARAÇÃO DE
ÉSTERES DE AROMA**

Prof. Dr. Alexandre Luis Parize

Coordenador de Estágio do Curso de Química-Bacharelado

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Maria da Graça Nascimento

Orientadora

Prof. Dr. Ricardo José Nunes

Prof. Dr. Fábio Zazyki Galetto

Florianópolis

Novembro /2015

Agradecimentos

Ao Deus, por ter me dado tudo o que eu tenho hoje.

À minha família, pelo apoio e incentivo para que eu conseguisse concluir mais uma etapa em minha vida.

Ao meu noivo Murilo pela paciência e compreensão, e por sempre me apoiar.

À professora Dra. Maria da Graça Nascimento pelo auxílio, dedicação, confiança, apoio e aprendizado.

À doutoranda Jaqueline Maria Ramos da Silva, por me ajudar em grande parte deste trabalho, estar sempre presente, me apoiando e incentivando.

À amiga Kamila, por estar comigo do início ao fim.

Aos colegas do laboratório 301/306, Jaque, César, Jullyety, Fernanda, Juana, Leandro, Iasmyny, Pamela, Paulo, Douglas e Igor pelas risadas e também pela colaboração.

Aos professores do Departamento de Química que colaboraram na minha formação acadêmica.

À Central de análises pelas análises realizadas.

À Dra. Gizelle Almerindo (DQ-UFSC) pela determinação da área superficial da bucha vegetal.

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e INCT-Catálise pelo suporte financeiro.

À Amano pela doação das lipases.

Ao laboratório LCME pela realização das Micrografias Eletrônicas de Varredura.

Enfim, a todos que contribuíram direta e indiretamente para elaboração deste trabalho.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 Enzimas	3
2.2 Lipases	5
2.3 Imobilização de Enzimas	6
2.4 Bucha Vegetal	7
2.5 Ésteres de Aroma	8
2.6 Líquidos Iônicos	10
3 OBJETIVOS	11
3.1. Objetivo Geral	11
3.2. Objetivos específicos	11
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
4.1. Equipamentos	12
4.2. Materiais e reagentes	12
4.3 Preparação dos Suportes	13
4.3.1 <i>Imobilização de Lipases em Bucha Vegetal</i>	13
4.3.1.1 Método 1	14
4.3.1.2 Método 2.....	14
4.3.2 <i>Imobilização de Lipases em Filmes Poliméricos</i>	15
4.4 Caracterização da bucha vegetal como suporte	15
4.5 Preparação do meio reacional e dos ésteres de aroma	16
4.6 Comparação de diferentes suportes na preparação dos ésteres 7-10	18
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
5.1 Caracterização do suporte.....	19
5.2 Influência da procedência da lipase.....	21
5.3 Massa da lipase F-AP15 e Reutilização	23

5.4 Influência do tempo de reação.....	25
5.5 Influência da temperatura	26
5.6 Influência do solvente	27
5.7 Influência do uso de misturas solvente orgânico/LIs	29
5.8 Influência do uso de diferentes suportes para a preparação de ésteres de aroma 7-10	33
6 CONCLUSÕES	37
7. REFERÊNCIAS.....	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática das estruturas das enzimas.	3
Figura 2: Representação do modelo encaixe-induzido.	4
Figura 3: Técnicas de imobilização de enzimas: a) aprisionamento, b) encapsulação, c) adsorção em suporte sólido, d) ligação cruzada.	6
Figura 4: Planta de <i>Luffa cylindrica</i> e seu fruto.	7
Figura 5: Cátions e ânions mais usados em líquidos iônicos.	10
Figura 6: Imobilização de lipases em BV pelo Método I.	14
Figura 7: Ilustração da imobilização de lipases em BV pelo Método II.	14
Figura 8: Ilustração da preparação do meio reacional.	16
Figura 9: Análise termogravimétrica da bucha vegetal.	19
Figura 10: MEV da bucha vegetal sem (a) e com (b) lipase F-AP15 imobilizada.	20
Figura 11: Conversão em octanoato de <i>n</i> -pentila utilizando lipases de diferentes procedências imobilizadas em BV.	21
Figura 12: Espectro de RMN de ¹ H para o octanoato de <i>n</i> -pentila.	22
Figura 13: Espectro de infravermelho do octanoato de <i>n</i> -pentila.	23
Figura 14: MEV do suporte com a lipase, após a reação de esterificação realizada em hexano 1º uso (a) e 6º uso (b).	25
Figura 15: Variação da conversão em octanoato de <i>n</i> -pentila em função do tempo	26
Figura 16: MEV do suporte com a lipase F-AP15 após reação em hexano (a) e em acetona (b). ..	28
Figura 17: Influência do uso de solventes orgânicos na preparação de 6	30

Figura 18: Influência da mistura éter etílico (EE) /LIs na preparação do octanoato de <i>n</i> -pentila	31
Figura 19: Influência da mistura éter <i>t</i> -butil-metílico/líquido iônico na preparação do octanoato de <i>n</i> -pentila.....	32
Figura 20: Conversão em acetato de geranoila usando PS-SD livre e imobilizada em filmes de amido de cará, de inhame e em bucha vegetal	33
Figura 21: Conversão em acetato de citroneila usando PS-SD livre e imobilizada em filme de gelatina e bucha vegetal	34
Figura 22: Conversão em acetato de benzila usando PS-SD livre e imobilizada em filme de amido de mandioca/PVA e bucha vegetal	35
Figura 23: Conversão em acetato de <i>n</i> -octila usando PS-SD livre e imobilizada em filme de amido de milho/dextrana e em bucha vegetal	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação das enzimas segundo a UIBBM.....	4
Tabela 2: Composição química da bucha vegetal	8
Tabela 3: Conversão em 6 usando lipase F-AP15 imobilizada em bucha vegetal. ..	23
Tabela 4: Variação da conversão em 6 em função da temperatura	27
Tabela 5: Influência do solvente orgânico na conversão do octanoato de <i>n</i> -pentila.	28

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Esterificação do ácido isobutírico com <i>n</i> -pentanol catalisada por lipase	5
Esquema 2: Exemplos de ésteres de aroma.....	9
Esquema 3: Preparação do octanoato de <i>n</i> -pentila (6) catalisada por lipases.....	9
Esquema 4: Reações de transesterificação para obter os ésteres 7-10	18

LISTA DE ABREVIATURAS

A12	Lipase de <i>Aspergillus niger</i> (120 000 u/g)
AK20	Lipase de <i>Pseudomonas fluorescens</i> (25 000 U/g)
AY30	Lipase de <i>Candida rugosa</i> (30 000 u/g)
AYS	Lipase de <i>Candida rugosa</i> (30 000 U/g)
[BMIM][BF ₄]	tetrafluoroborato de 1-butil-3-metil-imidazólio
[BMIM][Cl]	cloreto de 1-butil-3-metil-imidazólio
[BMIM][PF ₆]	hexafluorofosfato de 1-butil-3-metil-imidazólio
[BMIM][SCN]	tiocianato de 1-butil-3-metil-imidazólio
BV	Bucha Vegetal
ccd	cromatografia de camada delgada
F-AP15	Lipase de <i>Rhizopus oryzae</i>
FA	Filme de Amido
GA	Gel de Ágar
LIs	Líquidos Iônicos
M10	Lipase de <i>Mucor javanicus</i> (10 000 u/g)
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
PS-DI	Lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> (1638 U/g)
PS-IM	Lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> (500 U/g)
PS-SD	Lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> (30 000 U/g)
PVA	poli-álcool vinílico
RMN de 1H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
TGA	Análise Termogravimétrica
UIBBM	União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
U/g	Quantidade necessária para liberar 1,0 µmol/min de acetato de 1-feniletila a partir da transesterificação do álcool 1-feniletílico com acetato de vinila a 25 °C.
u/g	Quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 µmol/min de ácidos graxos do óleo de oliva, a pH 7,0 e 30°C.
u/mg	Quantidade necessária para liberar 1,0 µmol/min de ácidos graxos de um triacilglicerol, a pH 7,2 e 37°C.

RESUMO

As enzimas são proteínas que possuem atividade catalítica, tendo a função de aumentar a velocidade das reações químicas. Devido a fatores químicos, físicos ou biológicos, podem ter seu uso comprometido pela possibilidade da perda da atividade catalítica. Além disto, ainda podem se tornar instáveis e não suportar temperaturas muito elevadas ou solventes orgânicos. Para evitar a inativação da enzima, e proporcionar o uso em solventes orgânicos e a reutilização do catalisador, têm sido desenvolvidos métodos de imobilização. A bucha vegetal (BV) (*Luffa cylindrica*) é um excelente suporte para a imobilização de enzimas, pois apresenta baixo custo, e é biologicamente disponível e renovável. Neste trabalho o sistema bucha vegetal/lipase foi inicialmente utilizado na preparação do octanoato de *n*-pentila (**6**), sendo avaliada a procedência da lipase, tempo, temperatura, solvente orgânico, variação da massa e reutilização do suporte. A influência do uso da mistura de solvente orgânico/líquidos iônicos (LIs) (9:1 v/v) foi também estudada na obtenção deste éster. Foram preparados outros ésteres de aroma (acetatos de *n*-octila, de benzila, de geranoila e de citroneila), utilizando a lipase de *Burkholderia cepacia* (PS-SD) imobilizada em bucha vegetal e em outros suportes (gel de ágar (GA) e filme de amido de milho (FA)). Na obtenção do octanoato de *n*-pentila, as melhores lipases foram as F-AP15 e a PS-SD, formando o éster com conversões de 94 e 93%, sendo escolhida a F-AP15 para estudos posteriores. Foi observada uma relação do tempo de reação na obtenção de **6**, sendo que em 24h o éster foi obtido com conversão de 93%. A temperatura mais adequada na obtenção de **6** foi de 25°C. Foi possível reutilizar o sistema bucha vegetal/lipase F-AP15 por 5 vezes, obtendo **6** com conversões de 14-80% dependendo do método e da massa de lipase utilizada. Na preparação de **6**, observou-se a influência da polaridade do solvente orgânico, obtendo-se as maiores conversões ao usar hexano e heptano (93 e 99%). Ao avaliar a influência do uso de misturas solvente orgânico/LIs na preparação de **6**, os melhores resultados foram usando as misturas MTBE/[BMIM][PF₆], MTBE/[BMIM][BF₄] e MTBE/[BMIM][SCN] com a lipase imobilizada em BV; MTBE/[BMIM][SCN] com a lipase imobilizada em GA; EE/[BMIM][BF₄] com lipase adsorvida em BV; e EE/[BMIM][PF₆] e EE/[BMIM][Cl] ao usar a lipase imobilizada em FA(>99%). Na comparação dos suportes na preparação de diferentes ésteres de aroma, observou-se que ao utilizar a BV como suporte, os valores de conversão aos produtos foram próximos aos obtidos com a lipase imobilizada em FA, porém superiores aos obtidos com a lipase não imobilizada (forma livre). O método utilizado foi eficiente para a imobilização de lipases e obtenção de ésteres de aroma.

Palavras Chaves: esterificação, lipases, imobilização, bucha vegetal.

1. INTRODUÇÃO

A crescente demanda por produtos com fragrâncias idênticas às naturais faz com que indústrias alimentícias, farmacêuticas, e de cosméticos tenham interesse por ésteres de aroma. Estes compostos podem ser extraídos diretamente a partir de fontes naturais ou obtidas por síntese química. A extração implica um custo elevado por causa do rendimento e da escassez de alguns materiais naturais. Entretanto os compostos obtidos por este meio podem ser rotulados como naturais. Já a síntese química requer alta temperatura e o uso de catalisadores inorgânicos, que são agressivos ao meio ambiente. Além disso, os compostos obtidos não podem ser classificados como naturais, e as reações não são seletivas e consomem uma grande quantidade de energia.^{1,2}

Uma alternativa ambientalmente correta é o uso de enzimas e outros biocatalisadores para a preparação de ésteres, que permitem sínteses mais eficientes, não agredindo o meio ambiente. As lipases são enzimas, utilizadas como biocatalisadores em diversas reações, devido a sua ampla especificidade e boa estabilidade em diferentes meios reacionais. Entretanto, podem sofrer desnaturação devido o uso de solventes orgânicos e alta temperatura da reação.

A imobilização de lipases é uma técnica que pode contornar estes e outros problemas que ocorrem quando estas são utilizadas como biocatalisadores de reações orgânicas. Quando imobilizada, a lipase possui vantagens em comparação com a forma livre. Em geral, após imobilização as enzimas podem suportar temperaturas mais elevadas, solventes orgânicos, fácil reciclagem e reutilização.

Na literatura, têm sido apresentados diversos suportes para a imobilização de lipases, como por exemplo amidos de diferentes fontes, ágar, celulose, entre outros. Estes materiais são classificados conforme sua morfologia como porosos, não porosos e de estrutura de gel. O uso de suportes porosos é vantajoso, pois possui grande área superficial interna disponível para a imobilização de enzimas, que são adsorvidas no interior dos poros. A bucha vegetal é um excelente suporte para imobilização de lipases devido ser um material bastante poroso e formado de fibras celulósicas, permitindo uma melhor interação com o biocatalisador.

Neste trabalho foi avaliada a influência do uso de lipases de diferentes procedências e atividades imobilizadas em bucha vegetal para a obtenção do

octanoato de *n*-pentila, que é um dos ésteres de aroma responsável pelo aroma da manga. Foram avaliados também a influência da massa de lipase, método de imobilização; o uso de solventes orgânicos de diferentes polaridades, tempo, temperatura, bem como o uso de misturas solvente orgânico/líquidos iônicos (LIs) na obtenção do éster. Também foram preparados outros ésteres de aroma tais como os acetatos de *n*-octila, de geranoíla, de benzila e de citroneila, a fim de comparar a eficiência da bucha vegetal com outros suportes já descritos na literatura.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Enzimas

As enzimas são em geral proteínas, com exceção de um pequeno grupo de moléculas de ácido ribonucleico catalítico, e são formadas por α -aminoácidos ligados entre si por meio de ligações peptídicas. Possuem atividade catalítica, que aumentam a velocidade das reações químicas.^{3,4} Na maioria das vezes, as velocidades das reações catalisadas por enzimas são maiores, por fatores de 10^6 a 10^{23} , do que as velocidades das reações não catalisadas.^{4,5}

A enzima como proteína, possui quatro tipos de estruturas, sendo estas primária, secundária, terciária e quaternária. A sequência de aminoácidos diferentes em uma proteína, é a estrutura primária. A estrutura secundária geralmente é resultante de ligações de hidrogênio que ocorrem entre o hidrogênio do grupo $-NH$ e o oxigênio do grupo $C=O$. Quando as estruturas secundárias das proteínas se dobram sobre si mesmas, resulta em uma disposição espacial denominada de estrutura terciária. A estrutura quaternária é a união de várias estruturas terciárias que assumem formas espaciais bem definidas⁶, como mostra a **Figura 1**.



Figura 1: Representação esquemática das estruturas das enzimas.⁶

As reações químicas ocorrem no sítio ativo presente nas enzimas. O sítio ativo constitui uma parte relativamente pequena da estrutura e está, em geral, situado em uma fenda ou bolsão na superfície, na qual o substrato se liga. Esta fenda possui uma sequência de aminoácidos essenciais para catálise.^{5,7}

A especificidade da enzima por seu substrato é descrita pelo modelo encaixe induzido. No modelo proposto por Koshland, considera-se a flexibilidade conformacional e a interação entre a enzima e o substrato deve ocorrer apenas no estado de transição, admitindo uma mudança na conformação no sítio ativo, que sob a influência do substrato, irá se adequar ao mesmo, como apresentado na **Figura 2**.^{5,7,8}

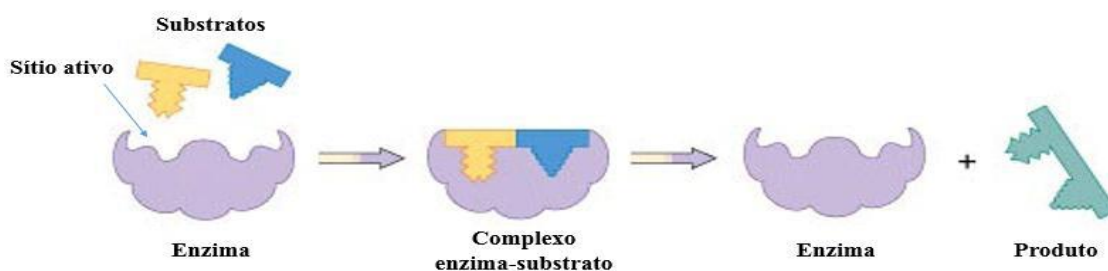


Figura 2: Representação do modelo encaixe-induzido.

Os reagentes que participam nas reações catalisadas por enzimas são chamados de substratos, e cada enzima tem um caráter específico, atuando sobre um determinado substrato convertendo-o em um determinado produto. Sendo assim, a atividade da enzima depende de diversos fatores, como a natureza do substrato, podendo este ser substituído por outros similares; da natureza do solvente e do pH. Cada enzima apresenta um valor de pH e temperatura ótimos.³

As enzimas são classificadas de acordo com o tipo de reação que catalisam. A União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (UIBBM) classifica as enzimas em seis classes, as quais são observadas na **Tabela 1**.^{3,7}

Tabela 1: Classificação das enzimas segundo a UIBBM.^{3,7}

Classe da Enzima	Tipo de reação catalisada	Exemplos de enzimas
Oxido-redutases	Oxidação-redução	Lactato desidrogenase
Transferases	Transferência de grupos (ex. aldeídos, cetonas, metilas).	Homocisteína metiltransferase
Hidrolases	Hidrólise/formação de ésteres, amidas, lactonas etc.	Quimotripsina, papaína, lipases, esterases.
Liases	Adição ou remoção de grupos pequenos em C=C, C=N, C=O	Fumarase
Isomerases	Isomerização	Mandelato racemase
Ligases	Ligação de dois substratos	Asparagina sintetase

Dentro da classe das hidrolases destacam-se as lipases, que são responsáveis pela hidrólise de ésteres (nos organismos vivos), principalmente os triacilgliceróis em ácidos graxos livres, di-acilglicerol, monoacilglicerol e glicerol.^{5,7,8}

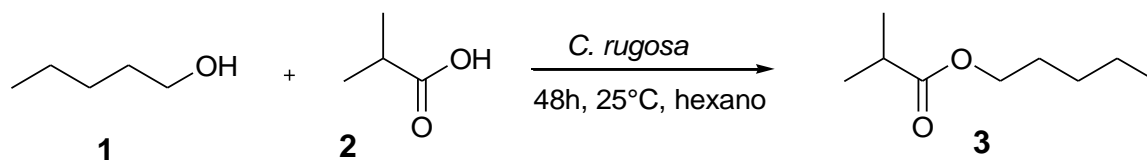
2.2 Lipases

Como citado, as lipases (triacilglicerol acil-hidrolases, EC 3.1.1.3) são uma família de enzimas que naturalmente catalisam a hidrólise de gorduras. No entanto, em condições adequadas, têm-se mostrado serem eficientes catalisadores nas reações de esterificação e transesterificação.²

Elas podem ser encontradas em plantas, animais e microrganismos, e são obtidas através da extração ou pelo cultivo.^{8,9} Alguns exemplos de microrganismos que produzem lipases são a *Candida rugosa*, *Candida antarctica* e *Rhizomucor miehei*, originadas de fungos, e *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas* sp originadas de bactérias.^{2,9}

São utilizadas como catalisadores naturais e possuem várias aplicações na indústria de alimentos, cosméticos, têxtil, celulose/papel, farmacêutica e na química fina.¹⁰ Por exemplo, na indústria de papel, a lipase catalisa a reação de hidrólise para produção de papel de alta qualidade; na indústria de cosméticos e farmacêuticos, a manteiga de cacau pode ser obtida por meio da reação de transesterificação. Na indústria de alimentos e de cosméticos, os ésteres de aroma podem ser obtidos a partir da reação de esterificação e transesterificação.¹¹

No **Esquema 1**, pode ser observada a esterificação do ácido isobutírico (**1**) com *n*-pentanol (**2**) catalisada pela lipase de *Candida rugosa*, na produção do éster de aroma isobutirato de *n*-pentila (**3**) com 90% de conversão.¹²



Esquema 1: Esterificação do ácido isobutírico com *n*-pentanol catalisada por lipase.¹²

Apesar de todas estas vantagens, a aplicação das lipases é muitas vezes dificultada pela falta de estabilidade, difícil recuperação, e reutilização da mesma.

Estas desvantagens podem, em geral, ser superadas pela imobilização destes biocatalisadores, de modo que fique confinado em um suporte, aumentando a atividade catalítica; e poder suportar altas temperaturas, meio não-aquoso e ainda serem reutilizados.^{8,13}

2.3 Imobilização de Enzimas

Como citado anteriormente, as enzimas estão sujeitas à inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos, podendo ocorrer quando estocadas ou durante o uso. Para que a catálise seja eficiente em uma reação, há necessidade de protegê-las da interação com o solvente orgânico, pois o mesmo poderia provocar a inativação, impossibilitando a catálise da reação. Diante este problema, métodos de imobilização têm sido desenvolvidos para fornecer a estabilidade das enzimas e facilitar sua recuperação e reutilização.^{3,14,15}

A imobilização de enzimas consiste no confinamento das mesmas em um determinado material, podendo ocorrer através de aprisionamento, encapsulação, adsorção ou ligação da enzima em um material insolúvel, como pode ser observado na **Figura 3**.^{14,16,17}

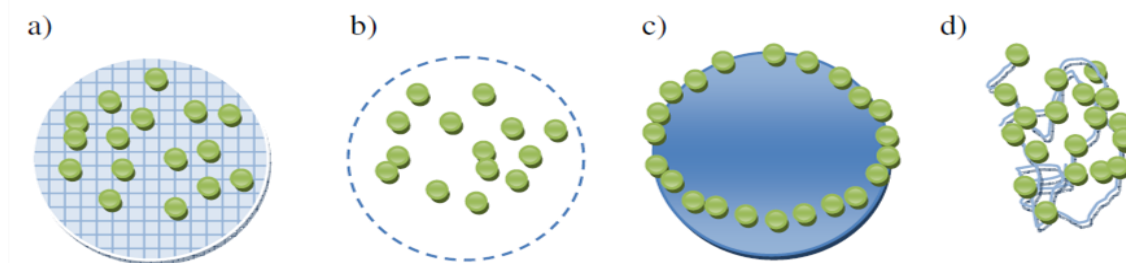


Figura 3: Técnicas de imobilização de enzimas: a) aprisionamento, b) encapsulação, c) adsorção em suporte sólido, d) ligação cruzada.¹⁷

Um dos métodos de imobilização mais utilizados é de adsorção, e é muito simples. A adsorção em um suporte sólido pode ser física, iônica ou colavente, sendo a adsorção física a mais utilizada, pois é a que causa menos danos a estrutura da enzima, além de ser simples e de baixo custo.^{14,18} O tipo predominante da interação depende da natureza química e das propriedades superficiais do suporte e da enzima.^{14,15}

O suporte a ser escolhido deve conter algumas características tais como grande área superficial, boa permeabilidade, estabilidade mecânica, química e térmica, características hidrofílicas, alta rigidez, forma e tamanhos adequados, resistência ao ataque de micro-organismos e ainda poder ser reutilizado.¹⁶

Podem ser utilizados como suportes materiais orgânicos e inorgânicos, como por exemplo, resinas acrílicas, carvão ativado, ágar, amido, quitosana, celulose, entre outros. Conforme sua morfologia, são classificados como materiais porosos, não porosos e de estrutura de gel.¹⁴⁻¹⁷ O uso de suportes porosos é vantajoso, pois possuem grande área superficial interna disponível para a imobilização de enzimas, que são adsorvidas no interior dos poros.¹⁵

Neste trabalho foi utilizada a bucha vegetal como suporte para imobilização de lipases por ser um material bastante poroso, de baixo custo, biodegradável, dentre outras características.

2.4 Bucha Vegetal

A bucha vegetal é um material natural, obtida da fruta madura e seca de *Luffa cylindrica*. Comumente chamada de esponja vegetal ou esponja de banho, é membro da família *Cucurbitaceae*. É produzida em abundância em países tropicais e subtropicais, principalmente no Brasil.^{19,20} A **Figura 4** mostra a planta de *Luffa cylindrica* e seu fruto maduro e seco.



Figura 4: Planta de *Luffa cylindrica* e seu fruto.

A bucha vegetal é usada para a higiene pessoal e limpeza doméstica, sendo comum em muitos países. O uso mundial da bucha está presente na agricultura, medicina, engenharia e biotecnologia ambiental, incluindo fins industriais e alimentos; sendo utilizada como esponja de banho, componente de amortecedores, revestimentos à prova de som, utensílios de limpeza, filtros em fábricas, biodiesel e extrações químicas.^{21,22}

Este material apresenta alto grau de porosidade, é não tóxica, de baixo custo apresenta propriedades físicas estáveis, e consiste em uma rede de fibras biodegradáveis. Sua composição química depende de diferentes fatores, tais como clima, qualidade do solo, período de colheita e idade da planta.²²⁻²⁴ Os dados da composição química das fibras da bucha vegetal são apresentados na **Tabela 2**.

Tabela 2: Composição química da bucha vegetal.²²

Componente	Conteúdo (%)
Holocelulose	84
α -celulose	66
Hemicelulose	17
Lignina	15
Extrativos	3,2
Cinzas	0,4

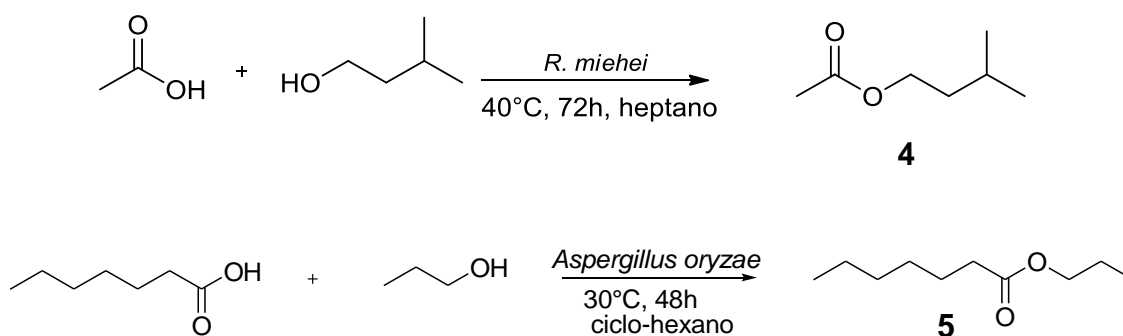
Tais características evidenciam a possibilidade de seu uso como suporte para imobilização de enzimas pelo método de adsorção, podendo-se utilizar a lipase imobilizada na obtenção de ésteres de aromas, os quais tem grandes aplicações na indústria de alimentos, como será mencionado a seguir.

2.5 Ésteres de Aroma

Ésteres de aroma são os componentes mais importantes e versáteis de sabores e aromas. Estes compostos são largamente utilizados nas indústrias de alimentos, bebidas, cosméticos e em produtos farmacêuticos.^{1,25}

Muitos ésteres simples são líquidos de odor agradável, os quais são responsáveis pela fragrância de flores e frutos. Por exemplo, o acetato de isopentila

(4) é um dos constituintes do óleo de banana, e foi sintetizado por Khan e Rathod utilizando a lipase de *Rhizomucor miehei* como biocatalisador, sendo obtido com 95% de conversão. O heptanoato de *n*-propila (5) foi preparado por Yan e col., e usando a lipase de *Aspergillus oryzae*, sendo obtido com 90% de conversão.^{1,12,26} O **Esquema 2** mostra a obtenção destes ésteres de aroma.

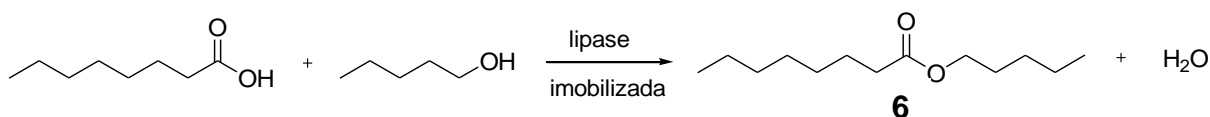


Esquema 2: Exemplos de ésteres de aroma.^{1,12}

A síntese *via* enzimática de ésteres de aroma vem ganhando cada vez mais atenção devido as vantagens de suas condições de reação suaves e alta eficiência catalítica.^{1,11,12}

Portanto, a obtenção destes compostos é de interesse e foi explorada neste trabalho. Como catalisador, foram usadas lipases imobilizadas em bucha vegetal e a reação foi realizada em condições brandas.

Preparou-se o octanoato de *n*-pentila (6), um éster artificial que compõe a mistura de compostos responsáveis pelo aroma de manga.²⁷ A equação química para preparação deste éster pode ser observada no **Esquema 3**. Outros ésteres de aroma também foram preparados (ver objetivos específicos).



Esquema 3: Preparação do octanoato de *n*-pentila (6) catalisada por lipases.

2.6 Líquidos Iônicos

Os líquidos iônicos (LIs) são sais de cátions orgânicos e ânions inorgânicos que existem no estado líquido à temperatura ambiente (**Figura 5**). Possuem propriedades únicas, como alta estabilidade térmica, excelente condutividade iônica, baixa pressão de vapor e potencial de dissolução elevado.²⁸

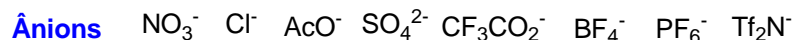
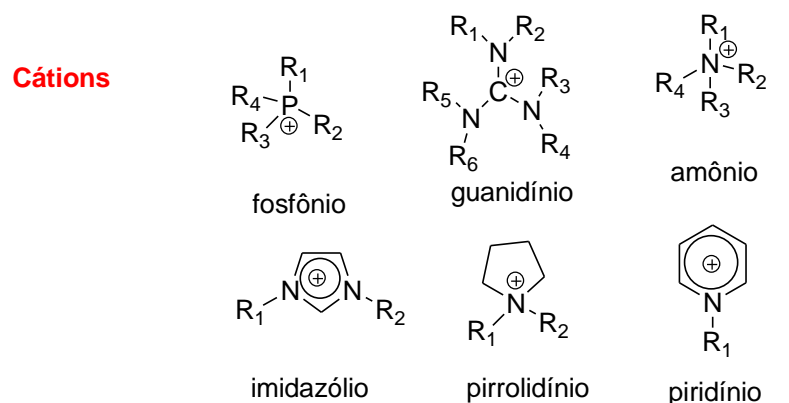


Figura 5: Cátions e ânions mais usados em líquidos iônicos.

A utilização de líquidos iônicos como solventes é um dos objetivos da química verde, pois estes fornecem um produto quimicamente mais sustentável e está recebendo um crescente interesse para muitos processos sintéticos e catalíticos. As propriedades únicas dos líquidos iônicos os tornam adequados para utilização em diferentes áreas, tais como a síntese orgânica, biocatálise, eletroquímica, química analítica, nanotecnologia, e a sua utilização como fluidos funcionais (por exemplo, lubrificantes, fluidos de transferência de calor, inibidores de corrosão).²⁹

Neste trabalho também será avaliada a influência do uso de misturas solventes orgânicos/LIs na preparação do octanoato de *n*-pentila.

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Imobilizar lipases de diversas procedências em bucha vegetal para serem utilizadas como catalisadores em reações de esterificação para produção de ésteres de aroma.

3.2. Objetivos específicos

- Imobilizar lipases em bucha vegetal (BV) por diferentes metodologias.
- Determinar a temperatura de decomposição da BV por análise termogravimétrica e medir a área superficial do suporte.
- Caracterizar a BV, com ou sem lipase imobilizada, por microscopia de varredura eletrônica (MEV) e determinar o teor de água pelo método de titulação de Karl-Fischer.
- Caracterizar e quantificar a obtenção do octanoato de *n*-pentila (**6**) por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ^1H) e determinar a pureza por cromatografia de camada delgada (ccd).
- Estudar a influência de lipases de diversas fontes e atividades e da variação da massa da lipase de *Rhizopus oryzae* (F-AP15) na preparação de **6**.
- Avaliar a reutilização da lipase F-AP15 imobilizada em bucha vegetal na preparação de **6**.
- Analisar a influência da temperatura e tempo da reação citada no item anterior.
- Estudar o efeito de solventes orgânicos de diferentes polaridades e do uso de misturas solventes orgânicos/LIs na conversão em **6**.
- Preparar outros ésteres de aroma, tais como os acetatos de benzila, *n*-octila, geranoíla e citroneíla comparando a eficiência da bucha vegetal com outros suportes já descritos na literatura.
- Determinar a conversão aos produtos por RMN de ^1H .
- Apresentar todos os resultados no Estágio Supervisionado II.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Equipamentos

Foram utilizados os equipamentos do Laboratório de Biocatálise, do de Catálise e Fenômenos Interfaciais, e da Central de Análises do Departamento de Química, e Laboratório Central de Microscopia Eletrônica, todos da UFSC.

Do laboratório de Biocatálise foram usados o Rotavapor: R II Buchi; balanças analíticas: Adventurer Ohaus-AR2140 e AND-EK200i; cromatógrafo a Gás Agilent 7820A e banho termostatizado Technal TE-0532

Do laboratório de Catálise e Fenômenos Interfaciais foi usado o analisador de área de superfície NOVA modelo 2200E Quantachrome Instruments.

Os equipamentos: Espectrofotômetro de infravermelho: Bruker ALPHA FT-IR spectrometer; Espectrômetro de RMN de ^1H : Varian AC 400F, 400MHz; e o Titulador 633 Automático Karl Fischer (Metrohm AG CH-9100 Herisau) foram usados da Central de Análises (DQ-UFSC).

O Microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM-6390LV) foi utilizado do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica.

4.2. Materiais e reagentes

Os materiais e reagentes usados neste trabalho foram bucha vegetal (Santa Clara - São Paulo) cortada em pequenos cubos; peróxido de hidrogênio (Vetec 30%); ácido octanóico (Vetec; 99,5%); álcool *n*-pentílico (Vetec; 99,0%); acetato de vinila (Fluka, 98%); álcool benzílico (Baker, 99,8%); geraniol (Sigma-Aldrich, 98%); citronelol (Fluka, 95%); *n*-octanol (GRP); solução tampão fosfato de potássio (pH 7,2, Vetec), ágar (ISOFAR) e sílica gel DGF Riedel-deHaën máx. 400 mesh.

Para a comparação dos suportes na preparação de diferentes ésteres de aroma, foram usados os seguintes itens na preparação dos filmes poliméricos: gelatina em pó G-2500.300 Bloom (Sigma), glicerol (Reagen), sorbitol (Vetec), amido de cará, inhame e mandioca (extraídos das correspondentes raízes), amido de milho (Duryla), álcool poli-vinílico – PVA (Vetec), dextrana de *Leuconostocme senteroides* (Sigma 95%).

Foram também usadas as lipases de *Burkholderia cepacia* (PS Amano DI, 1638 U/g; PS Amano SD, 30,000 U/g; PS Amano IM, 500 U/g); *Rhizopus oryzae* (F-AP15, 150 u/mg); *Candida rugosa* (AY Amano 30, 30,000 u/g, AYS Amano 30,000 U/g); *Pseudomonas fluorescens* (AK Amano 20, 25,000 U/g); *Aspergillus niger* (A Amano 12, 120,000 u/g) e *Mucor javanicus* (M Amano 10, 10,000 u/g).

Os solventes utilizados foram: *n*-hexano (Synth); *n*-heptano (Vetec); acetonitrila (Vetec); acetona (Merck); éter etílico (F. Maia); éter metil-*t*-butílico (Vetec); diclorometano (Vetec); clorofórmio (Synth); tolueno (Merck); ciclohexano (Vetec). Para as análises de RMN de ¹H utilizou-se o clorofórmio deuterado (Aldrich 99,9). Os líquidos iônicos hexafluorofosfato de 1-butil-3-metil-imidazol (Fluka, 96%); tetrafluorborato de 1-butil-3-metil-imidazol (Fluka, 97%); tiocianato de 1-butil-3-metil-imidazol (Fluka, 97%) e cloreto de 1-butil-3-metil-imidazol (Fluka, 99%) foram usados nos estudos do efeito do solvente.

4.3 Preparação dos Suportes

4.3.1 Imobilização de Lipases em Bucha Vegetal

Primeiramente, a bucha vegetal foi colocada em solução de peróxido de hidrogênio 30% por 24 h, seca, cortada em pequenos cubos e utilizada na imobilização das lipases. A seguir, lipases de diversas procedências foram imobilizadas na BV (itens 4.3.1.1 e 4.3.1.2).

Este suporte com e sem lipase, foi caracterizado medindo-se sua área superficial, análises de micrografia eletrônica de varredura (MEV) de superfície e medidas de TGA. As análises de MEV foram feitas antes e após a imobilização da lipase F-AP15. Também foi determinado o teor de água (%) do suporte através do método de titulação por Karl-Fisher. Os métodos usados para a realização destas caracterizações estão descritos no item 4.6.

O sistema bucha vegetal/lipase, foi utilizado na preparação do octanoato de *n*-pentila (6). Outros ésteres de aroma, tais como os acetatos de geranoila (7), de citroneila (8), de *n*-octila(9) e de benzila (10) foram preparados a fim de comparar a BV com outros os suportes usados para imobilização de lipases, e já descritos usando a lipase de *Burkholderia cepacia* (item 4.5).

4.3.1.1 Método 1

Pesou-se 500 mg de bucha vegetal em um erlenmeyer e adicionou-se 50 mL de solução tampão fosfato de potássio (pH 7,2). Após 24 h de imersão, transferiu-se a bucha “úmida” para outro erlenmeyer contendo 10, 20 ou 30 mg da lipase F-AP15 (ou outras lipases) e 25 mL de hexano. O sistema foi agitado (agitação magnética) por 30 min. A seguir, transferiu-se a bucha para uma placa de Petri e secou-se em capela por aproximadamente 48 h. (**Figura 6**).

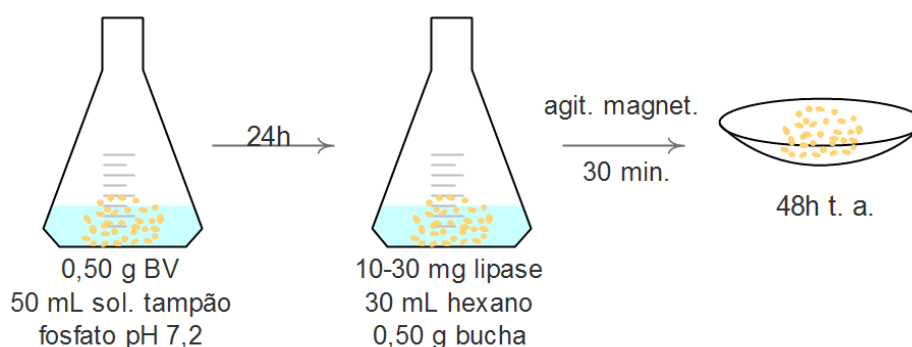


Figura 6: imobilização de lipases em BV pelo Método 1.

4.3.1.2 Método 2

Foram pesados 500 mg da bucha vegetal e colocados em uma placa de Petri. Dissolveu-se 10, 20 ou 30 mg de lipase em 20 mL de solução tampão fosfato de potássio (pH=7,2), e colocou-se sobre o suporte. O sistema foi seco em capela por aproximadamente 48 h. (**Figura 7**)

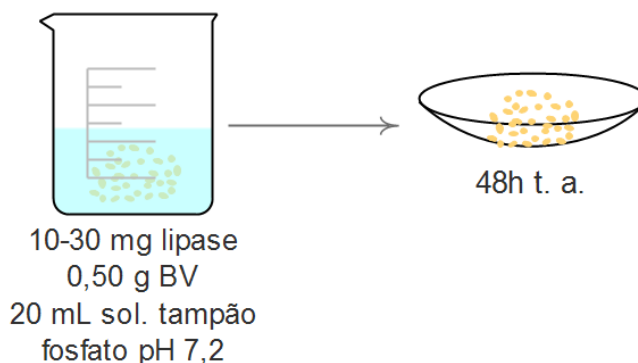


Figura 7: Ilustração da imobilização de lipases em BV pelo Método 2.

4.3.2 Imobilização de Lipases em Filmes Poliméricos

Os filmes de amido ou gelatina foram preparados de acordo com a seguinte metodologia: em um béquer de 50,0 mL foram adicionados 0,80g ou 1,00g de amido ou gelatina e, quando necessário, de 0,20 g de dextrana ou PVA. A mistura foi dissolvida em 20,0 mL de água destilada e então adicionou 0,30 g de glicerol ou 0,30 g de sorbitol (agentes plastificantes). A solução formada foi mantida em agitação magnética e com aquecimento de aproximadamente 55 °C, até a completa dissolução. Resfriou-se a solução até aproximadamente 30 °C e adicionou-se a lipase (20-60 mg). O sistema foi agitado por mais 10 min e a solução colocada em placas de Petri e levada a capela para evaporação da água (~24h.).³⁰⁻³³

Após evaporação da água, os filmes com as enzimas imobilizadas foram cortados em pedaços pequenos e transferidos para um erlenmeyer de 150 mL contendo solvente orgânico para serem usados nas reações de transesterificação do acetato de vinila com os álcoois benzílico, geraniol, citronelol e *n*-octanol.

4.4 Caracterização da bucha vegetal como suporte

4.4.1. A análise Termogravimétrica

A análise Termogravimétrica (TGA) foi realizada no Laboratório de Síntese de Cristais Líquidos e Materiais Moleculares. A amostra foi submetida sob ar sintético (atmosfera oxidante) – 20 mL/min, em uma panelinha de platina, aquecimento de 30 °C a 900 °C, com uma taxa de 10 °C/min.

4.4.2. Área superficial

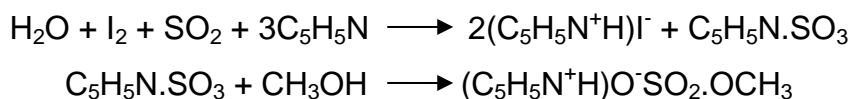
A determinação da área superficial foi realizada utilizando o analisador de superfície NOVA modelo 2200e Quantachrome Instruments. Esta, foi realizada utilizando ~0,094 g de bucha vegetal a uma temperatura de 196 °C por adsorção e dessorção de azoto na amostra em condições de pressão de vácuo a 0,100 mmHg.

4.4.3. Microscopias de varredura eletrônica

As imagens dos suportes (aumento de 100x e 500x), antes e após a imobilização da lipase e reação, foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura JEOL modelo JSM-6390LV. A bucha vegetal, com ou sem a lipase foi colocada num suporte metálico, e as amostras foram fixadas neste suporte com fita adesiva de carbono dupla face, revestidas com ouro, e então analisadas.

4.4.4. Determinação da quantidade de água (%)

O método de titulação de Karl Fisher foi utilizado para determinar o teor de água do suporte imobilizado antes e após a reação, na presença de vários solventes usando Titulador 633 Automatic Karl Fischer Metrohm AG CH-9100 Herisau. Este método baseia-se na determinação quantitativa de água em uma solução anidra de dióxido de enxofre e iodo.³⁴



As quantidades de água são expressas em porcentagem (%).

4.5 Preparação do meio reacional e dos ésteres de aroma

O sistema bucha vegetal/lipase, foi inicialmente utilizado na preparação do octanoato de *n*-pentila (**6**), sendo avaliados a procedência da lipase; influência do tempo, temperatura, solvente orgânico; variação da massa e reutilização do suporte. A influência do uso da mistura de solvente orgânico/líquidos iônicos (9:1 v/v) foi também estudada na obtenção deste éster.

Outros ésteres de aroma, citados anteriormente, foram preparados a fim de comparar a BV com outros os suportes usados para imobilização de lipases (item **4.5**) e já descritos usando a lipase PS-SD.

Para realizar as reações de esterificação e transesterificação citadas acima, foram adicionados em um erlenmeyer de 150 mL contendo a lipase imobilizada e 25

mL de solvente orgânico (*n*-hexano e/ou outros), 5 ou 10 mmol de álcool e 5 ou 10 mmol de ácido carboxílico ou éster (acetato de vinila). A mistura foi colocada em banho termostatzado com agitação (Technal TE-0532) por 24 h. As reações foram monitoradas por cromatografia de camada delgada, usando como eluente hexano:acetato de etila (7:3 v/v). Após 24 h, a mistura reacional foi separada da bucha vegetal ou dos filmes poliméricos, e transferida para um balão. O suporte foi lavado com solvente orgânico até que não houvesse mais a presença dos reagentes (conferido através de ccd), e o solvente evaporado em rota-evaporador. Após esta averiguação, este sistema pode ser reutilizado em outras reações de esterificação ou transesterificação.

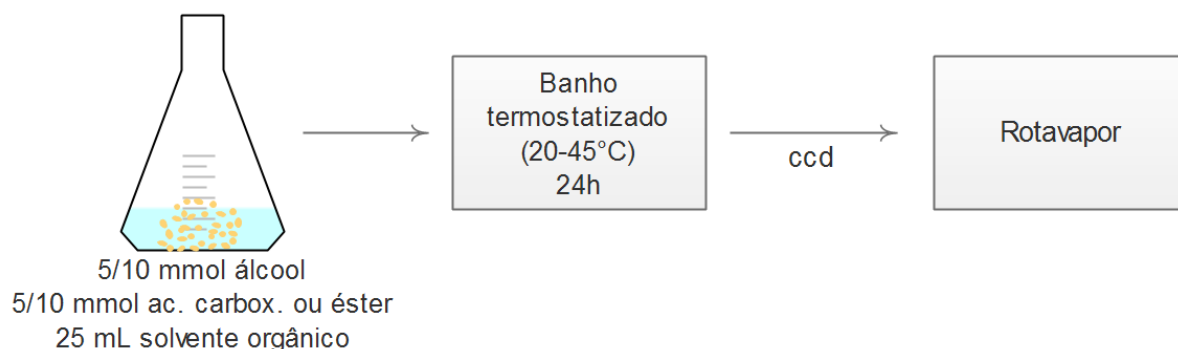


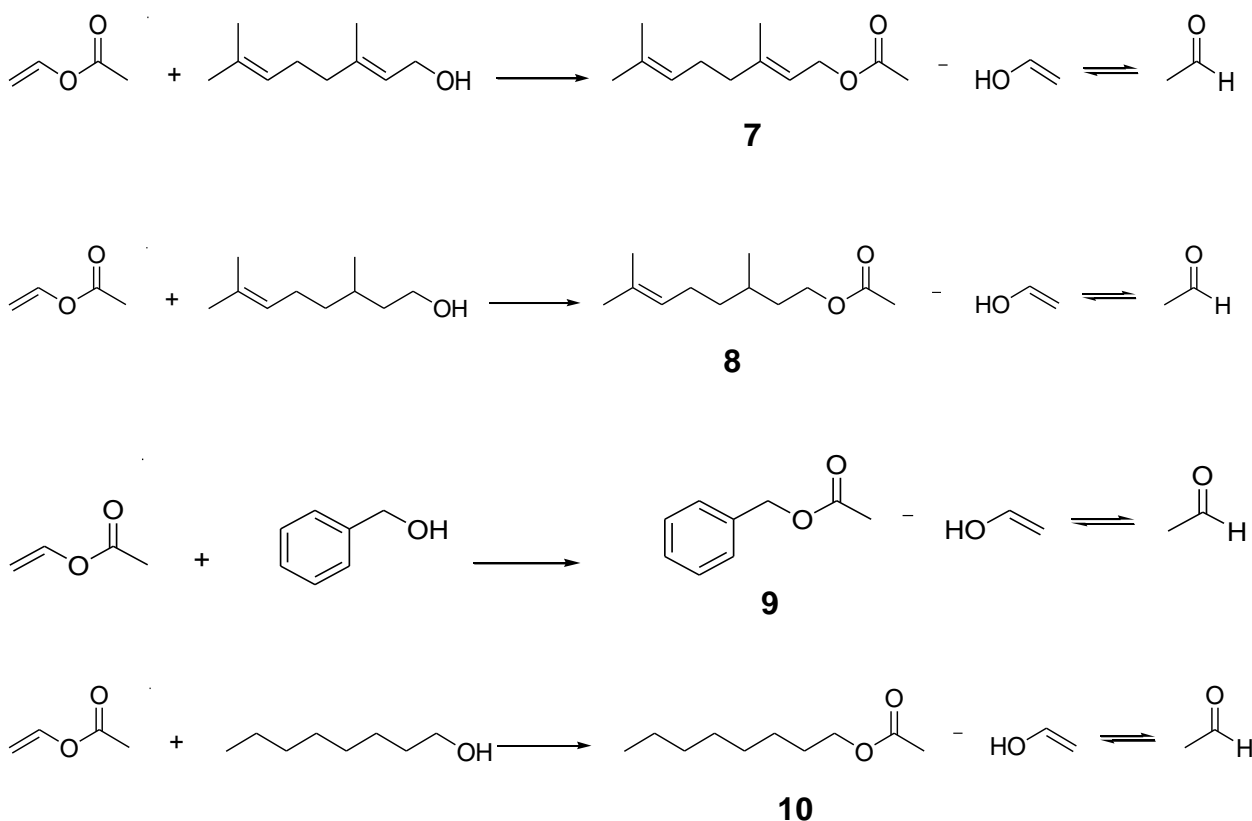
Figura 8: Ilustração da preparação do meio reacional.

A quantificação do produto foi feita por análises de cromatografia gasosa com detector de ionização de chama. A separação foi realizada utilizando a coluna Shimadzu PLQ-5-M25-025m, com programa de temperatura da coluna de 80-250 °C (10 °C / min). As temperaturas de injetor e do detector foram ajustados em 280 °C e 290 °C, respectivamente. A taxa de fluxo do gás de arraste de hidrogênio foi de 7 mL / min, resultando em um tempo de análise de 10 minutos (tempo de retenção para *n*-pentanol = 1,7 min, tempo de retenção para octanoato de *n*-pentila = 6,9 min.).

Os produtos foram caracterizados e quantificados por RMN de ¹H comparando os prótons metilênicos próximos ao grupo éster (4,05 ppm) do produto formado com os do álcool (3,65 ppm) (**Figura 12**)

4.6 Comparação de diferentes suportes na preparação dos ésteres 7-10

A lipase PS-SD foi imobilizada em bucha vegetal, e a eficiência deste suporte foi comparada com outros na preparação de diferentes ésteres de aroma: acetato de geranoila (**7**), acetato de citroneila (**8**), acetato de benzila (**9**) e acetato de *n*-octila (**10**); através da reação dos correspondentes álcoois com acetato de vinila (**Esquema 4**).



Esquema 4: Reações de transesterificação para obter os ésteres 7-10.

Os suportes que foram comparados com a bucha vegetal, foram os filmes de amido de milho/dextrana, de amido de mandioca/PVA, amido de cará, amido de inhame e gelatina.

A separação dos produtos e monitoramento das reações foi feita conforme descrito no item **4.5**.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho, a bucha vegetal foi utilizada como suporte para imobilização de lipases de diferentes procedências e atividades. Primeiramente foi realizada a caracterização do suporte com ou sem lipase, e a seguir foram avaliados diversos parâmetros na reação de esterificação do ácido octanoico com o *n*-pentanol. Posteriormente foi avaliada a influência do uso de diferentes suportes para a preparação de outros ésteres de aroma. Os resultados estão apresentados a seguir.

5.1 Caracterização do suporte

A bucha vegetal foi caracterizada medindo-se a área superficial, análise termogravimétrica (TGA) e fazendo análises de micrografias em microscópio eletrônico de varredura (MEV).

Primeiramente foi determinada a temperatura de decomposição da BV para que posteriormente fosse realizada a área de superfície. A **Figura 9** mostra o gráfico da análise termogravimétrica (TGA).

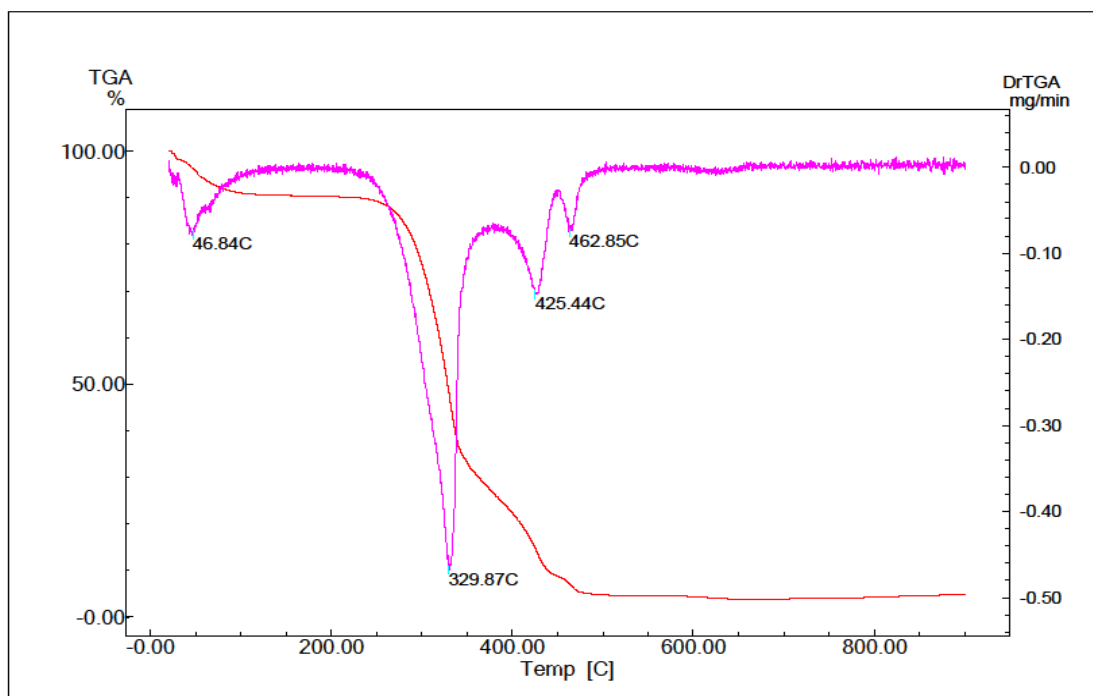


Figura 9: Análise termogravimétrica da bucha vegetal. [Condições de análise: ar Sintético (atmosfera oxidante) – 20 mL/min, 30 °C - 900 °C, taxa de 10 °C/min].

Observa-se que o material não apresenta água adsorvida ($\sim 100^{\circ}\text{C}$), e que a taxa de degradação máxima foi observada em 329°C . A partir de 500°C , verifica-se uma baixa percentagem de resíduos. Estes dados indicam que a bucha vegetal (BV) é bastante estável e, portanto adequada para imobilização de enzimas, em especial as lipases que foram usadas neste trabalho.

Em seguida, foi determinada a área da superfície do suporte e foram obtidos valores médios de duas determinações de $0,633\text{ m}^2/\text{g}$.

Após imobilização das lipases, foram feitas análises de MEV. Para efeitos de comparação, as **Figuras 10a e 10b**, mostram as imagens de MEV do suporte sem e com lipase F-AP15 antes da reação de obtenção do octanoato de *n*-pentila.

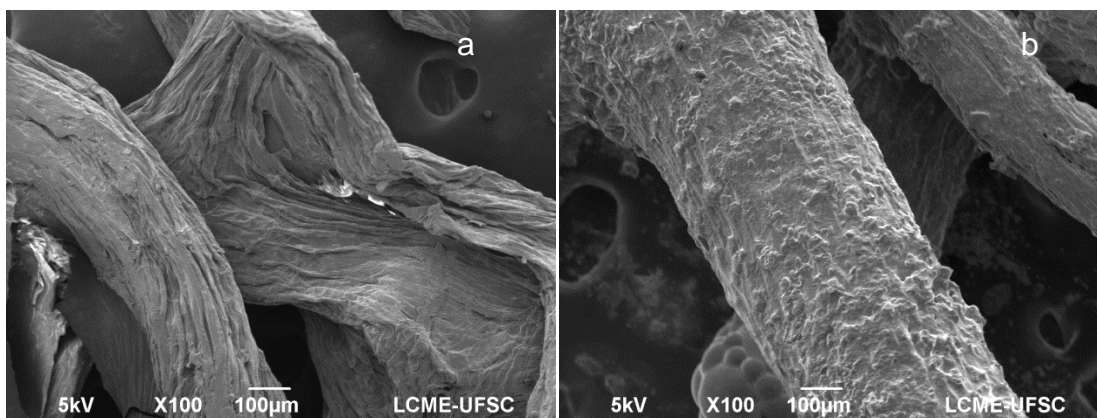


Figura 10: MEV da bucha vegetal sem (a) e com (b) lipase F-AP15 imobilizada. (ampliação 100x)

Como pode ser observada na **Figura 10b**, a lipase foi adsorvida sobre o suporte. Este é um método de imobilização de enzimas, que se baseia na adsorção física da lipase sobre a superfície de um suporte insolúvel em água, provocando pouca ou nenhuma alteração conformacional da enzima ou a destruição do seu sítio ativo.¹⁴

Após imobilização de lipases na BV, este sistema foi usado para a obtenção do octanoato de *n*-pentila (**6**) em diferentes condições experimentais, tais como a influência do uso de diversas lipases, tempo, temperatura, massa de lipase, solvente orgânico puro e/ou em misturas com LIs.

5.2 Influência da procedência da lipase

Inicialmente, lipases de diferentes procedências foram imobilizadas na bucha vegetal (BV). Estes suportes foram utilizados na reação de esterificação do ácido octanoico com o *n*-pentanol, sendo que a formação e quantificação do éster foram realizadas através da técnica de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H). Na **Figura 11** são apresentados os dados obtidos de conversão em 24 h.

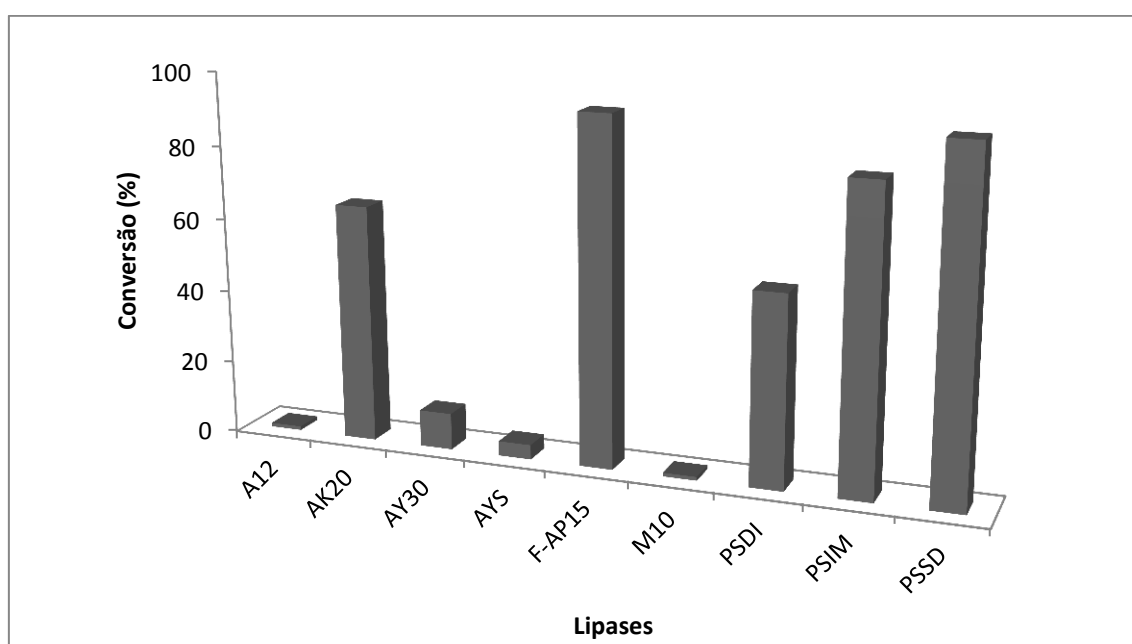


Figura 11: Conversão em octanoato de *n*-pentila utilizando lipases de diferentes procedências imobilizadas em BV. [Condições reacionais: 20 mg lipase; *n*-hexano (25 mL); 25°C; 24 h; ácido octanóico (10 mmol); *n*-pentanol (10 mmol). Conv. determinada por RMN de ^1H].

Observa-se na **Figura 11** que utilizando as lipases AYS, M10, A12 e AY30 imobilizadas em BV como catalisadores da reação, a conversão ao éster **6** foi inferior ou igual a 10%. Ao utilizar a lipase PS-DI, o éster foi obtido com 52% de conversão, e com a lipase AK 20, a conversão foi de 65%. Ao usar a lipase PS-IM, a conversão foi de 82%. Ao usar a lipase PS-SD, o éster foi obtido com conversão semelhante ao obtido com a lipase F-AP 15. Nota-se que ao usar as lipases F-AP 15 (150 U/g) ou PS-SD (30 000 U/g) imobilizadas, o éster **6** foi obtido com conversão de 94%, não dependendo da atividade das lipases.

Considerando estes resultados, a lipase F-AP 15 foi selecionada para os próximos estudos.

A **Figura 12** mostra o espectro de ressonância magnética de hidrogênio (RMN de ^1H) para o octanoato de *n*-pentila. Observa-se um tripleto na região de 4,05 ppm, que se refere aos 2 hidrogênios metilênicos próximos ao grupo éster. Na região de 3,65 ppm observa-se um tripleto referente aos 2 hidrogênios metilênicos próximos ao grupo álcool do *n*-pentanol.

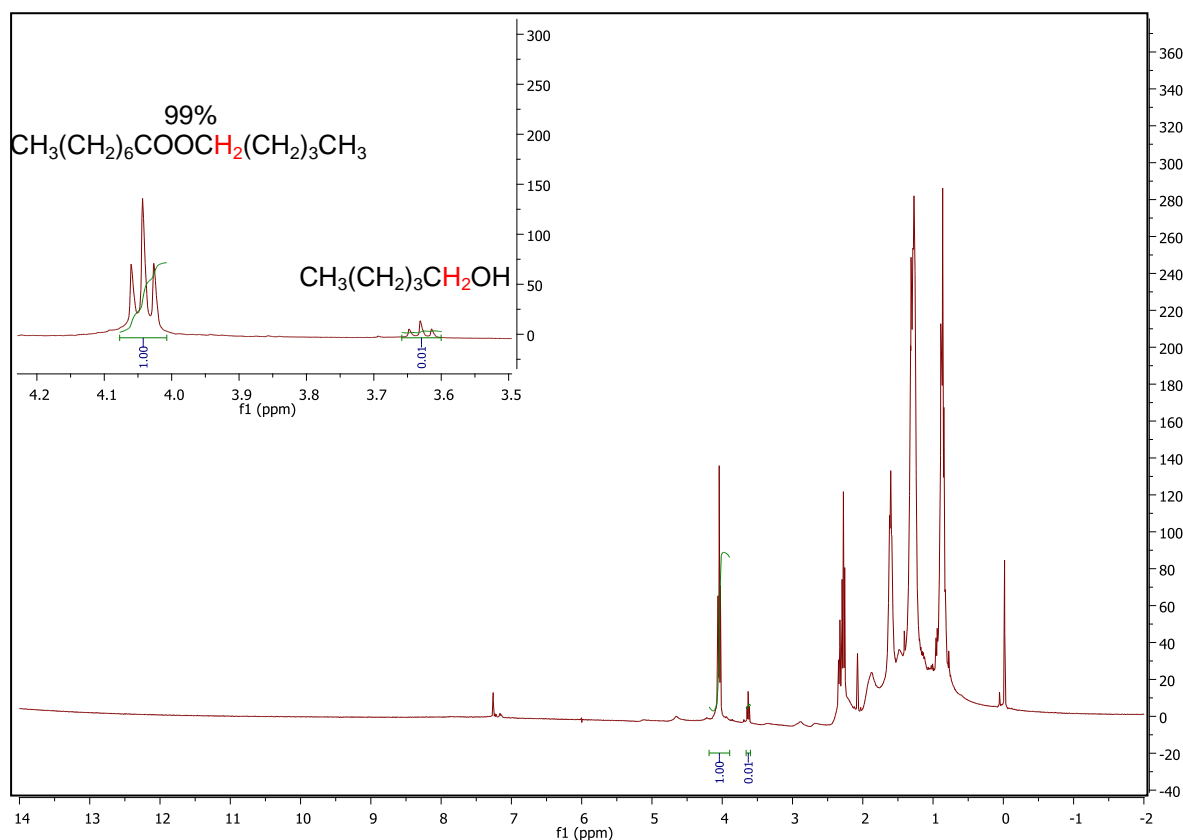


Figura 12: Espectro de RMN de ^1H para o octanoato de *n*-pentila (400 MHz, CDCl_3).
(conversão 99 %)

O espectro de infra-vermelho do octanoato de *n*-pentila pode ser observado na **Figura 13**. Nota-se uma banda característica de carbonila de ésteres na região de $\sim 1735\text{ cm}^{-1}$. Na região de $2950\text{--}2850\text{ cm}^{-1}$ são observadas bandas referentes aos C-H alifáticos do produto. A banda de absorção da ligação C-O característica de ésteres é observada em $\sim 1100\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$. Estes valores são concordantes com os citados na literatura para estes grupos funcionais.³⁵

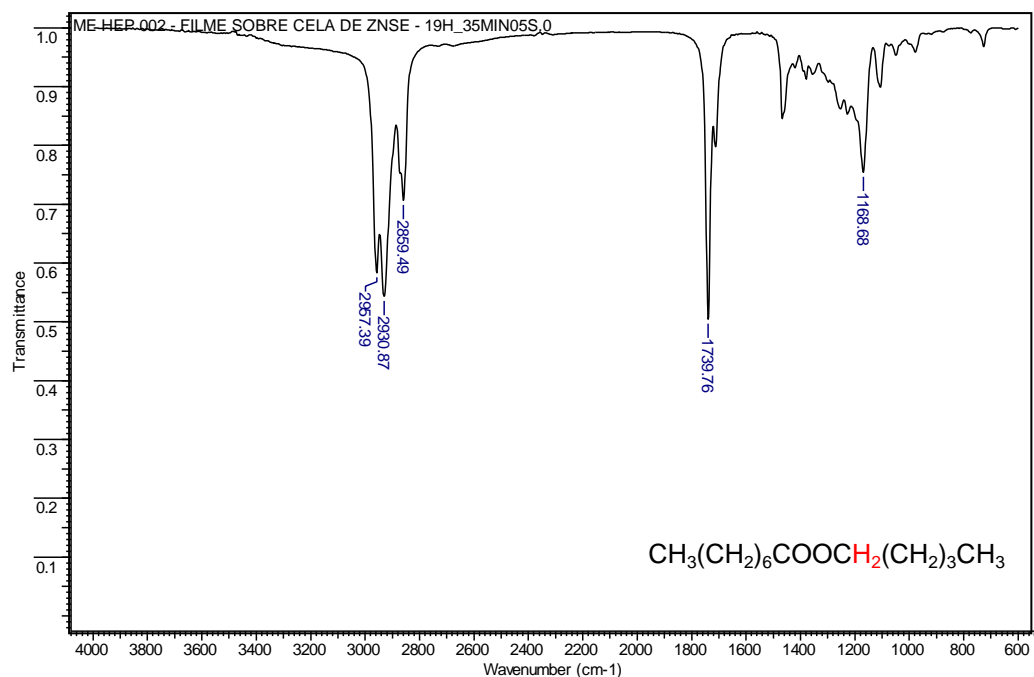


Figura 13: Espectro de infravermelho do octanoato de *n*-pentila.
(Filme sobre cela de ZnSe).

Após a caracterização do éster **6**, foi avaliada a influência do método de imobilização e da massa da lipase F-AP15, entre outros parâmetros.

5.3 Massa da lipase F-AP15 e Reutilização

Para avaliar a eficiência da metodologia de imobilização, diferentes quantidades da lipase F-AP15 foram imobilizadas em bucha vegetal. Em seguida, estes foram utilizados como catalisadores para obter **6** (Tabela 3).

Tabela 3: Conversão em **6** usando lipase F-AP15 imobilizada em bucha vegetal.

	Método 1			Método 2		
Massa de F-AP15 (mg)	10	20	30	10	20	30
Conversão (%) ^(a,b)	35	99	99	95	93	97
1 ^a Reuso	35	96	98	80	85	87
2 ^a Reuso	35	96	97	78	85	85
3 ^a Reuso	18	95	97	78	66	84
4 ^a Reuso	14	94	92	78	57	84
5 ^a Reuso	14	80	80	64	52	78

Condições reacionais: *n*-hexano (25 mL); 25 °C; 24 h; ácido octanoico (10 mmol), 1-pentanol (10 mmol), (a) primeiro uso (b) determinado por RMN de ¹H.

Pode-se observar na **Tabela 3** que, em geral, usando ambos os métodos, houve relação da conversão ao produto com a quantidade de enzima. Isto é o esperado, pois, devido ao aumento da massa do biocatalisador, a probabilidade do substrato encontrar o sítio ativo da lipase torna-se maior, resultando numa maior percentagem de formação de produto.

Usando o Método 1, com 10 mg de F-AP15, as conversões a **6** foram baixas variando de 35% na primeira utilização para 14% na quinta reutilização. Quando foram utilizados 20 e 30 mg, os valores de conversão foram mais elevados, sendo que o éster foi obtido com 80 a 99% com ambas massas da lipase F-AP15.

Quando foi utilizado o Método 2, no primeiro uso, as conversões variaram de 93-97% ao usar as diferentes massas da lipase. Ao reutilizar a bucha vegetal com 10 mg de F-AP15 pela primeira vez, a conversão do produto diminuiu para 80% e manteve-se quase constante até a quarta reutilização, mas no quinto reuso, **6** foi obtido com 64%. Quando foi utilizado 20 mg da lipase, a formação do produto foi constante no primeiro e no segundo reuso (85%), diminuindo gradativamente até ser obtido com 52% na última reutilização. Usando 30 mg de F-AP15, houve pequena variação da conversão em **6**, da primeira para a quarta reutilização (84-87%). No quinto reuso, **6** foi obtido com 78% de conversão.

Estes resultados mostraram a estabilidade da lipase imobilizada em bucha vegetal, pois o sistema pode ser reutilizado até 5 vezes, obtendo-se conversões do éster de 14 a 80%.

Em concordância com estes resultados, as imagens de MEV mostraram a presença de lipase no suporte após a primeira e sexta utilização, quando a reação foi realizada em hexano (**Figuras 14a e 14b**).

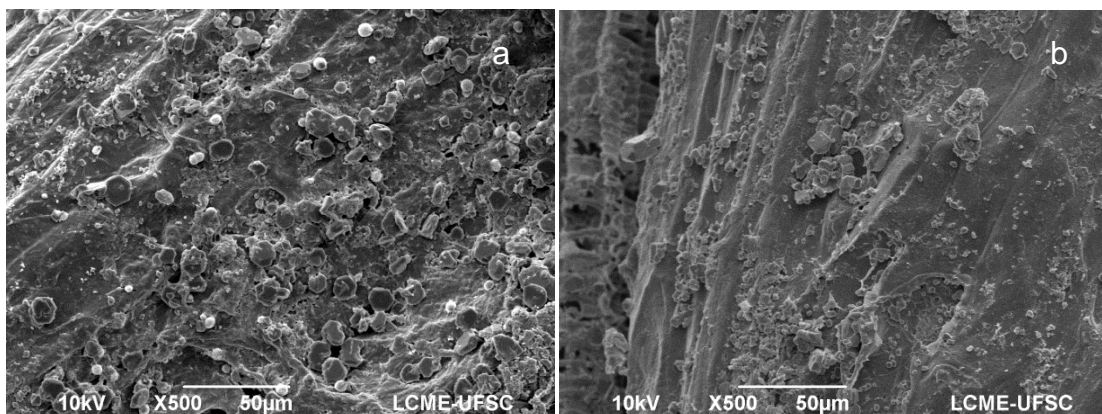


Figura 14: MEV do suporte com a lipase, após a reação de esterificação realizada em hexano 1º uso (a) e 6º uso (b). (ampliação 500x)

De modo geral, foram obtidos bons resultados com a lipase imobilizada por ambos os métodos. No entanto, é descrito na literatura que o pH afeta fortemente a atividade da enzima. Sendo assim, como no método 2 foi usado solução tampão, este e a massa de 20 mg de lipase foram selecionados, para efetuar os próximos estudos que incluem os efeitos do tempo, temperatura e do meio reacional.

5.4 Influência do tempo de reação

O estudo do tempo da reação deve ser otimizado para determinar o momento em que a conversão ao produto é máxima, evitando desperdícios e aumentando a eficiência econômica da reação. Por exemplo, este estudo mostrou-se de extrema importância na epoxidação quimio-enzimática do citrônolol, sendo que em 24h obteve-se o correspondente epóxido e o epóxido-ester.³⁶

Foram retiradas alíquotas da reação em 2, 4, 8, 10 e 24h para posterior análises por RMN de ¹H. A **Figura 15** mostra os resultados de conversão ao octanoato de *n*-pentila.

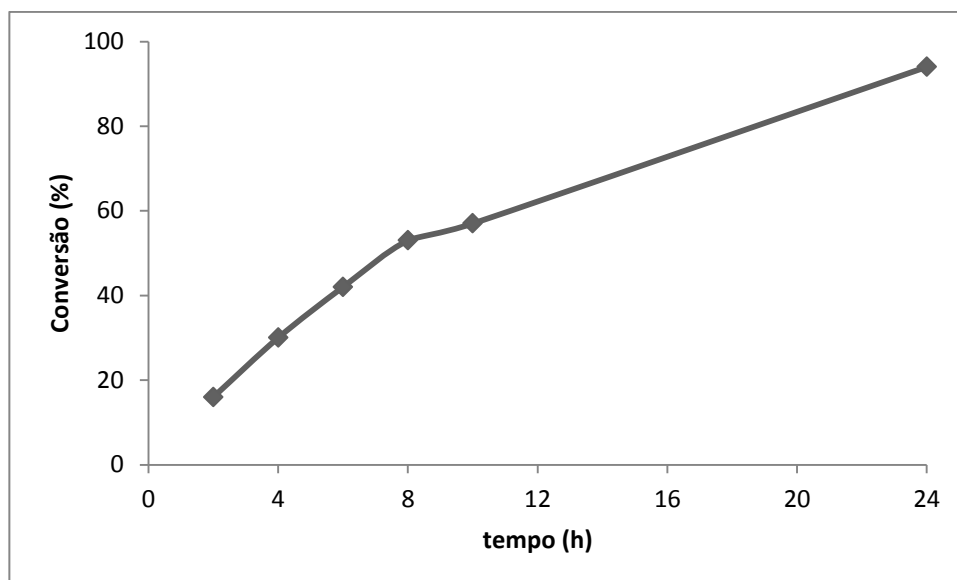


Figura 15: Variação da conversão em octanoato de *n*-pentila em função do tempo. [Condições reacionais: F-AP15 (20 mg); *n*-hexano (25 mL); 25 °C; 24 h; ácido octanóico (10 mmol); *n*-pentanol (10 mmol); conv. determinada por RMN de ¹H].

Analisando **Figura 15**, pode-se observar um aumento na conversão com o aumento do tempo de reação. Em 2h, o valor de conversão foi de 16%, e este foi aumentando com o tempo. Obtiveram-se valores de 30%, 42% e 52% em 4, 6 e 8h, respectivamente. Os maiores valores de conversão em octanoato de *n*-pentila foram obtidos após 10 e 24h de reação, sendo de 57 e 94%, respectivamente, não sendo necessário avaliar tempos maiores para esta reação. Portanto, o tempo de 24h foi selecionado para avaliar a influência da temperatura.

5.5 Influência da temperatura

A temperatura tem um papel significativo nas reações catalíticas. Por exemplo, o aumento da temperatura da reação pode reduzir a viscosidade de misturas, alterar a solubilidade e as interações entre partículas catalíticas e substratos. Nas reações catalisadas por enzimas, a alta temperatura pode afetar a conformação da enzima, levando a perda de atividade e seletividade. Deste modo, é necessário selecionar a temperatura desejada para obter a atividade enzimática ótima.³⁷

Para avaliar a influência da temperatura na conversão em **6**, as reações foram realizadas entre 20 e 45 °C, utilizando 20 mg de FAP-15 imobilizada em bucha vegetal. Os resultados de conversão são observados na **Tabela 4**.

Tabela 4: Variação da conversão em **6** em função da temperatura

Temperatura (°C)	20	25	30	35	40	45
Conversão (%)	98	93	88	97	82	96

[Condições reacionais: F-AP15 (20 mg); n-hexano (25 mL); 24 h; ácido octanóico (10 mmol); n-pentanol (10 mmol); FAP-15 (20 mg), conv. determinada por RMN de ¹H].

Ao analisar a **Tabela 4**, nota-se que não houve variação significativa na conversão em octanoato de *n*-pentila. Os maiores valores de conversão foram de 98%, 97% e 96% em 20, 35 e 45 °C, respectivamente. Nesse caso optou-se por usar a temperatura de 25 °C nos estudos futuros, por ter sido obtida boa conversão ao éster, além de ser próxima à ambiente, não necessitando de muita energia para o aquecimento ou resfriamento da reação.

5.6 Influência do solvente

Em reações biocatalisadas, a escolha do solvente orgânico é um fator importante a ser considerado. Os solventes orgânicos oferecem várias vantagens, como aumentar a solubilidade dos substratos e a estabilidade da enzima. A literatura mostra que a atividade enzimática é fortemente influenciada pela escolha do solvente orgânico, e as reações realizadas utilizando solventes com um $\log P > 4,0$ tendem a ser mais eficientes.^{38,39}

Solventes orgânicos de diferentes polaridades foram utilizados para avaliar a sua influência na preparação do octanoato de *n*-pentila, utilizando como biocatalisador a lipase F-AP15 imobilizada em bucha vegetal.

A **Tabela 5**, apresenta os dados de conversão para a obtenção do octanoato de *n*-pentila.

Tabela 5: Influência do solvente orgânico na conversão do octanoato de *n*-pentila.

Solvente	Log P^a	Conversão (%) ^b	Conteúdo de água (%) ^c
Heptano	4.00	>99	16,3
Ciclohexano	3.20	93	19,7
Hexano	3.50	93	18,0
Tolueno	2.50	73	19,0
Cloroformio	2.00	2	0,31
Diclorometano	1.50	2	0,32
MTBE	1.43	15	0,38
Éter etílico	0.85	2	0,38
Acetona	-0,23	2	0,38
Acetonitrila	-0.33	3	0,44

Condições reacionais: F-AP15 (20 mg); solvente orgânico (25 mL); 25 °C; 24 h; ácido octanoico (10 mmol); *n*-pentanol (10 mmol); (a) referência 39; (b) determinado por RMN de ¹H; (c) determinado por titulação Karl-Fisher.

Primeiramente, é importante comparar os dados da **Tabela 5** com as análises de MEV. Após a reação de esterificação, pedaços pequenos do suporte foram removidos da reação, secos à temperatura ambiente e analisados (**Figuras 16a e 16b**).

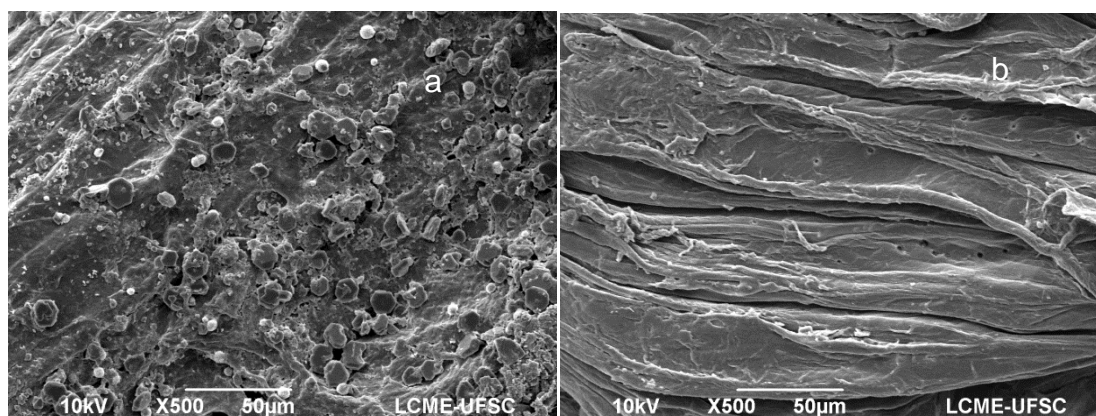


Figura 16: MEV do suporte com a lipase F-AP15 após reação em hexano (a) e em acetona (b). (ampliação 500x).

Na obtenção do octanoato de *n*-pentila foi observada uma relação direta da conversão ao éster com a polaridade dos solventes (expresso pelo $\log P$), exceto para o MTBE, em que a conversão ao éster foi de 15%. Ao usar ciclo-hexano e hexano a conversão ao octanoato de *n*-pentila foi de 93%. Utilizando heptano a conversão ao éster foi >99 %, e na presença de tolueno este valor foi de 73%. Quando foram usados acetonitrila, acetona, éter etílico, diclorometano e clorofórmio, as conversões ao éster foram menores que 3 %.

Em concordância com estes resultados, as imagens de MEV mostram a presença da lipase quando a reação foi realizada em hexano (**Figura 16a**). No entanto, após a reação com acetona, pouca quantidade de enzima foi detectada no suporte (**Figura 16b**). Provavelmente, este solvente polar retira a maior parte da água e, conseqüentemente da lipase a partir da superfície, levando a menores valores de conversão ao octanoato de *n*-pentila. Estes resultados também coincidem com os dados obtidos para a quantidade de água (%) na bucha vegetal. A **Tabela 5** mostra que, após a reação na presença de solventes apolares, estes valores são de 16-19%, e na presença dos solventes polares estes valores são menores que 1%.

Na literatura está descrito que enzimas necessitam de uma quantidade mínima de água para manter sua atividade catalítica.^{8,40} Os sistemas reacionais usados na reação são não aquosos e a água presente no meio é oriunda do suporte, do subproduto da reação de esterificação, e da imobilização da lipase. Deste modo a água presente na bucha vegetal é extremamente importante, já que auxilia na manutenção da atividade catalítica da lipase.

5.7 Influência do uso de misturas solvente orgânico/LIs

Na tentativa de utilizar solventes polares nas reações biocatalisadas, foi realizado um estudo comparando a eficiência da mistura de diferentes líquidos iônicos (LIs) com dois solventes polares.

Inicialmente foi avaliada a influência do uso de solventes orgânicos de diferentes polaridades na preparação de **6** usando a lipase PS-SD imobilizada em BV como biocatalisador da reação. Os dados de conversão podem ser observados na **Figura 17**. Parte destes resultados foram publicados recentemente.⁴¹

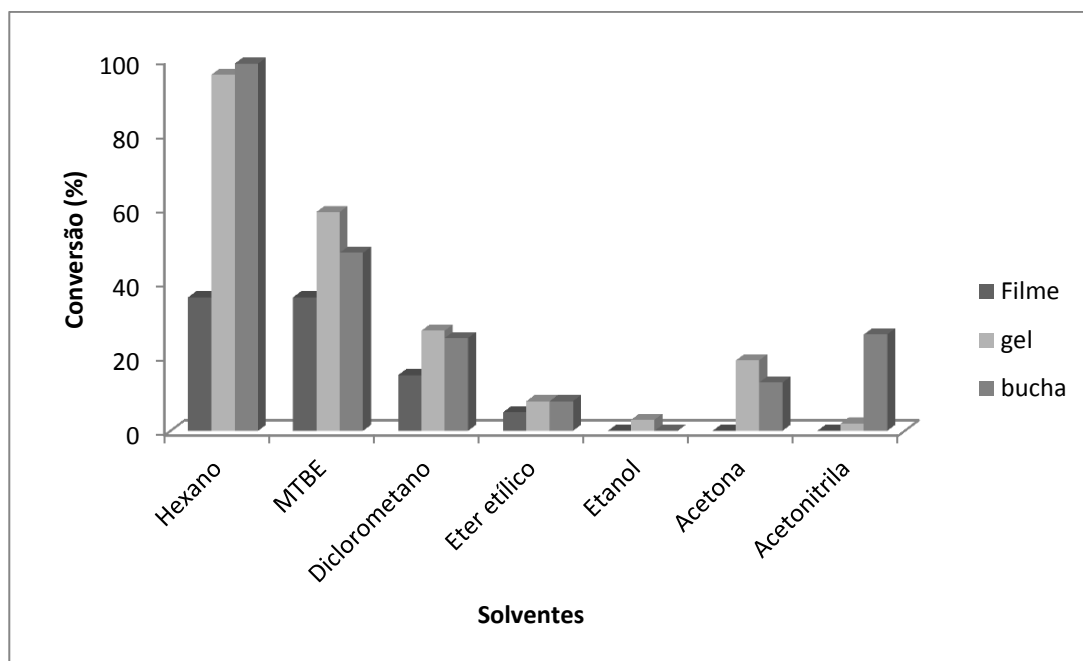


Figura 17: Influência do uso de solventes orgânicos na preparação de **6**. [Condições reacionais: 10 mmol *n*-pentanol, 10 mmol ácido octanoico, 30 mg PS-SD imobilizada em diferentes suportes, 30 mL solvente orgânico, 24 h, 25°C. Conversão determinada por CG.)

De acordo com os dados da **Figura 17**, pode-se observar que usando hexano **6** foi obtido com boas conversões (36-99%) independente do suporte. Esses resultados estão de acordo com a literatura, pois as reações realizadas utilizando solventes apolares tendem a ser mais eficientes.³⁹ No entanto, ao usar os solventes polares, como éter *t*-butil-metílico (MTBE) ($\log P=1,43$) e éter etílico ($\log P=0,85$), o éster foi obtido com conversões moderadas (36%, 59%, 48%) a ruins (5%, 8%, 8%), usando filme de amido, gel de ágar e bucha vegetal como suportes para imobilização da PS-SD.

A partir destes resultados, foram escolhidos o éter etílico e o éter *t*-butil-metílico para serem usados nas misturas com os líquidos iônicos derivados do 1-butil-3-metil-imidazolio sendo os tetrafluorborato de 1-butil-3-metil-imidazol ([BMIM][BF₄]), hexafluorofosfato de 1-butil-3-metil-imidazol ([BMIM][PF₆]), cloreto de 1-butil-3-metil-imidazol ([BMIM][Cl]) e tiocianato de 1-butil-3-metil-imidazol ([BMIM][SCN]).

Este estudo foi realizado usando como biocatalisador, a lipase PS-SD (LBC) imobilizada em filme de amido de milho, gel de ágar e bucha vegetal. As **Figuras 18 e 19** mostram as conversões ao produto usando as misturas solvente orgânico/LIs.

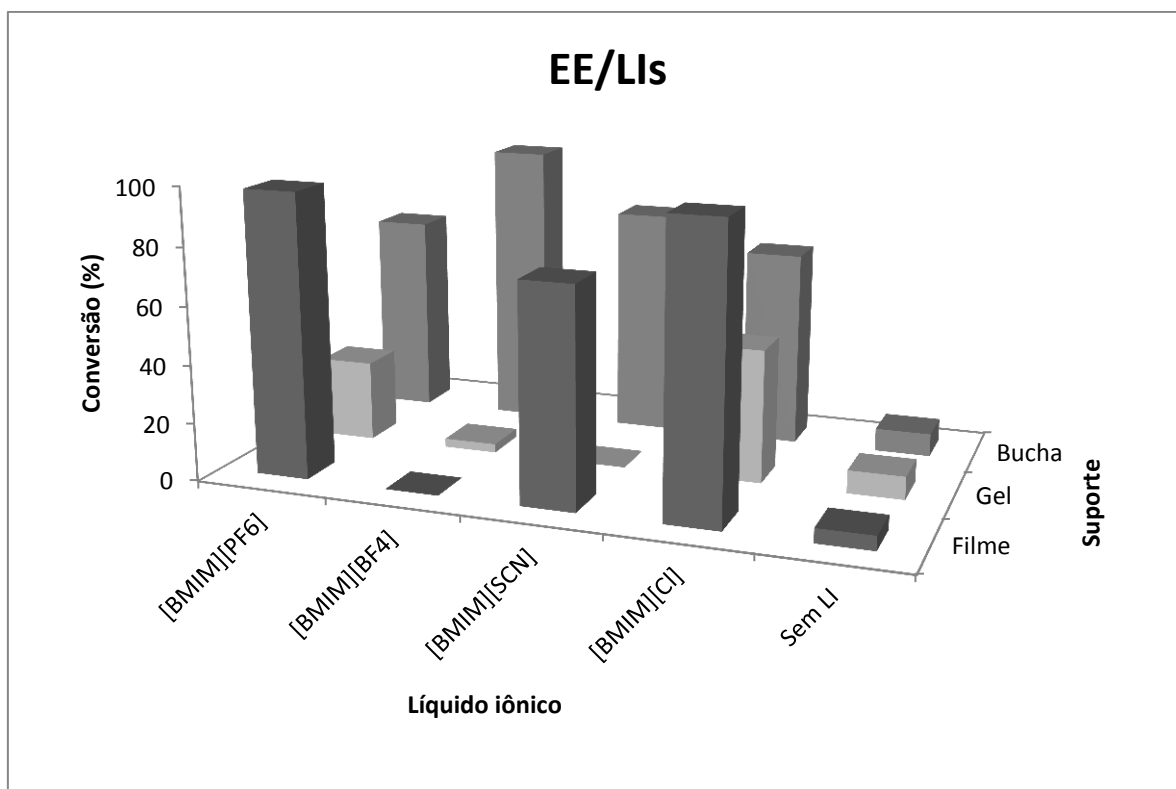


Figura 18: Influência da mistura éter etílico (EE) /LIs na preparação do octanoato de *n*-pentila. [Condições reacionais: 10 mmol *n*-pentanol, 10 mmol ácido octanoico, 30 mg PS-SD imobilizada em diferentes suportes, éter etílico:LIs 9:1 (v/v), 24 h, 25°C. Conversão determinada por CG.)

Pode-se observar na **Figura 18** que ao usar apenas o éter etílico como solvente da reação, **6** foi obtido com conversões de 5% a 8%, usando a lipase imobilizada nos três suportes. Ao usar a lipase imobilizada na bucha vegetal, o produto foi obtido com conversões de 68 a 99%, quando foram utilizadas as misturas EE/LIs. Quando foi usado o gel de ágar, **6** foi obtido com conversões razoáveis (3-46%). Ao usar as misturas de éter etílico com [BMIM][PF₆] e [BMIM][Cl], o octanoato de *n*-pentila foi obtido com conversões de 98 e 99% respectivamente, quando foi utilizado o sistema filme de amido/lipase. Com exceção dos sistemas filme de amido em meio orgânico de EE/[BMIM][BF₄] e o gel de ágar em EE/[BMIM][BF₄] e EE/[BMIM][SCN], **6** foi obtido com excelentes conversões (35-40%) quando comparado a apenas usar o solvente puro.

As conversões ao octanoato de *n*-pentila usando as misturas éter etílico/LIs podem ser observadas na **Figura 19**.

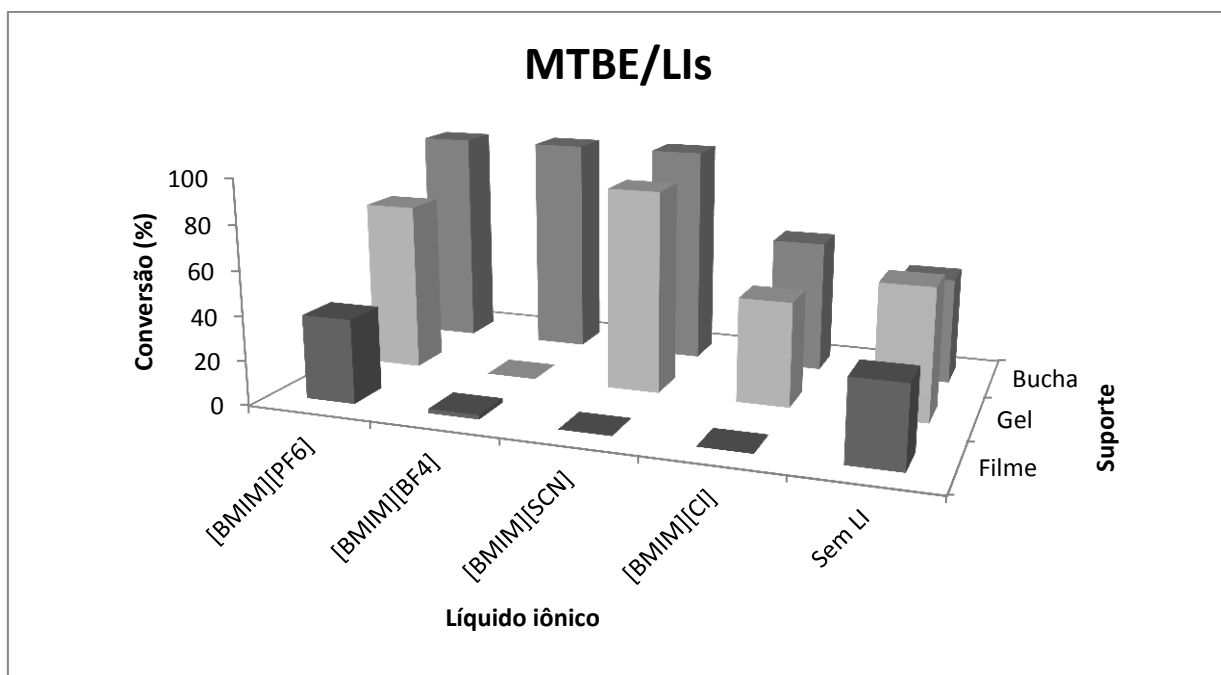


Figura 19: Influência da mistura éter *t*-butil-metílico/líquido iônico na preparação do octanoato de *n*-pentila. [Condições reacionais: 10 mmol *n*-pentanol, 10 mmol ácido octanoico, 30 mg PS-SD imobilizada em diferentes suportes, éter *t*-butil-metílico:LIs 9:1 (v/v), 24 h, 25°C. Conversão determinada por CG.]

Ao observar os dados apresentados na **Figura 19**, nota-se que a conversão em **6** usando lipase imobilizada em bucha vegetal, foi > 99% ao usar as misturas MTBE/[BMIM][PF₆], MTBE/[BMIM][BF₄], MTBE/[BMIM][SCN]. Ao usar as misturas MTBE/[BMIM][PF₆] e MTBE/[BMIM][SCN], o octanoato de *n*-pentila foi obtido com valores superiores (76% e 91%) aos obtidos com o solvente orgânico puro (59%), quando foi utilizado o gel de ágar como suporte para a PS-SD. Com a lipase F-AP15 imobilizada em filme de amido de milho, as conversões em **6** foram semelhantes ao usar apenas o solvente orgânico puro ou com a mistura MTBE/[BMIM][PF₆], sendo de 36% e 38%, respectivamente.

Estes resultados mostraram que o meio reacional teve grande influência na formação do éster **6**.

5.8 Influência do uso de diferentes suportes para a preparação de ésteres de aroma 7-10

Neste estudo, foi realizada uma comparação da bucha vegetal com outros suportes tais como os filmes de amido de cará, de amido de inhame, de amido de mandioca/PVA, de amido de milho/dextrana e de gelatina, usando a lipase PS-SD imobilizada. Estes sistemas foram utilizados em trabalhos realizados no laboratório de Biocatálise do Departamento de Química da UFSC.³⁰⁻³³

Foram realizadas quatro reações, usando as mesmas condições reacionais dos trabalhos anteriores, porém, como suporte para imobilização da lipase, foi usado a bucha vegetal.

A **Figura 20** mostra a conversão em acetato de geranoila (**7**) usando lipase PS-SD livre e imobilizada em filmes de amido de cará, de inhame e em bucha vegetal.

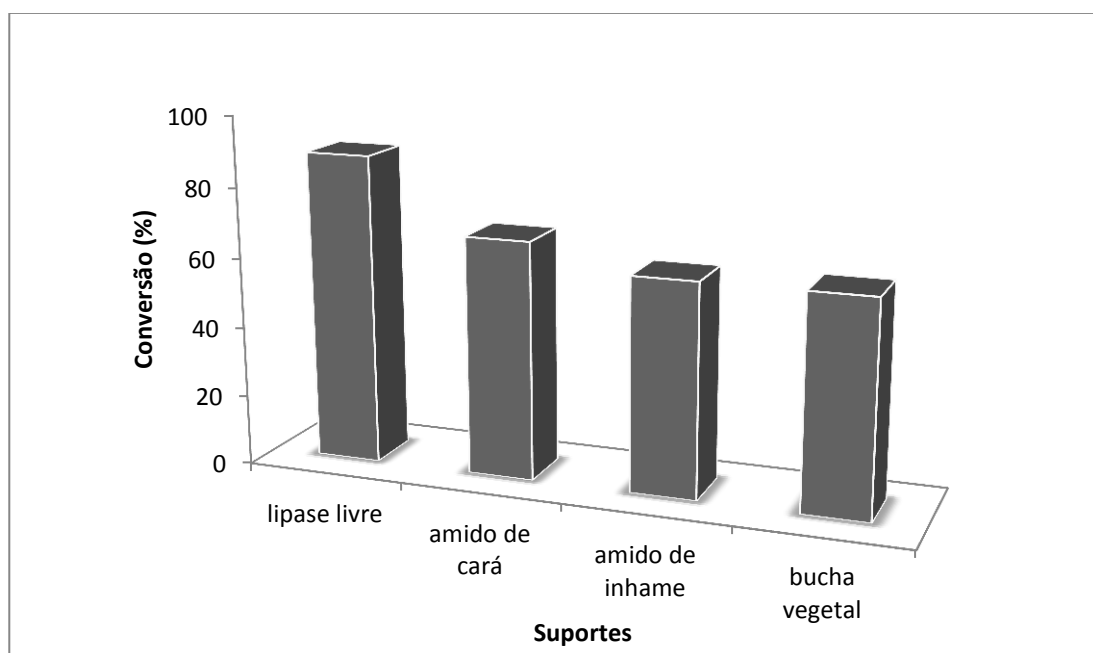


Figura 20: Conversão em acetato de geranoila usando PS-SD livre e imobilizada em filmes de amido de cará, de inhame e em bucha vegetal. [Condições reacionais: hexano (25 mL); 35 °C; 24 h; 60 mg PS-SD; acetato de vinila (5 mmol); geraniol (5 mmol); tempo da reação com a lipase livre: 96h; 1,0g amido/0,3g sorbitol; conversão determinada por RMN de ¹H.]

Ao observar a **Figura 20**, nota-se que a conversão em **7**, ao usar PS-SD imobilizada em filme de amido de cará, foi de 68%. Ao usar a lipase imobilizada em

filme de amido de inhame e em bucha vegetal, a conversão foi de 61%. Ao usar a lipase na forma livre, o éster foi obtido com 88,5% de conversão. Entretanto, este valor de conversão (88,5%) foi obtido com 96 h de reação. Estes dados indicam que mesmo os valores de conversão ao produto sendo um pouco inferiores ao usar PS-SD imobilizada, foi possível obter uma conversão superior quando o tempo reacional foi de 96h.

A conversão em acetato de citroneila (**8**) usando PS-SD livre e imobilizada em filme de gelatina e em bucha vegetal pode ser observada na **Figura 21**.

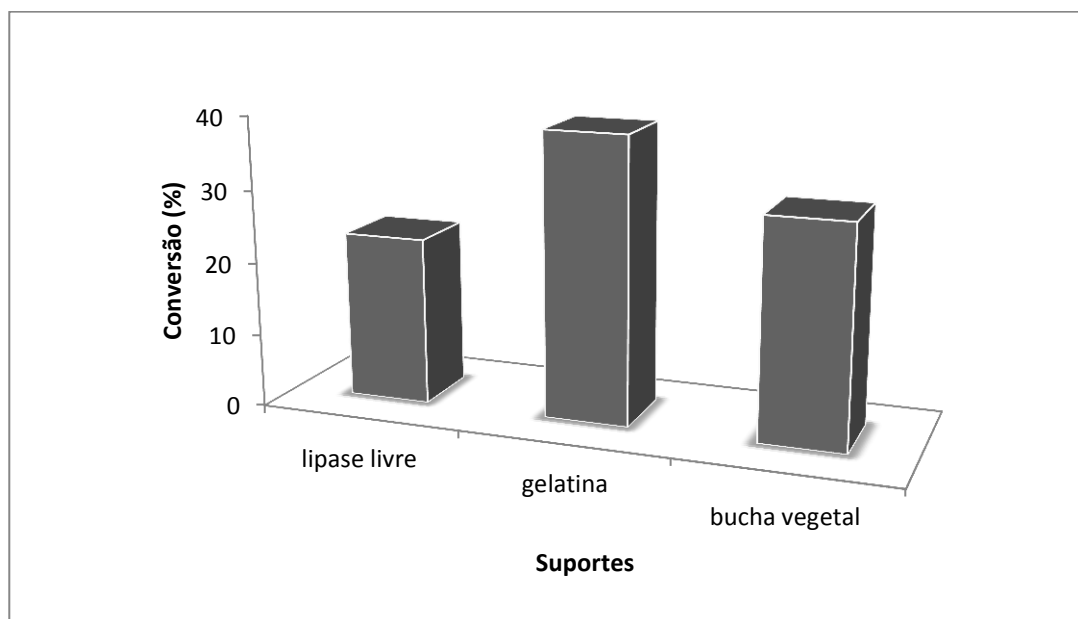


Figura 21: Conversão em acetato de citroneila usando PS-SD livre e imobilizada em filme de gelatina e bucha vegetal.[Condições reacionais: hexano (25 mL); 35 °C; 24 h; 20 mg PS-SD; acetato de vinila (5 mmol); citrônolol (5 mmol); tempo da reação com a lipase livre: 96h; 1,0g gelatina/0,3g sorbitol; conversão determinada por RMN de ^1H .]

Pode-se observar na **Figura 21** que ao usar o filme de gelatina como suporte na imobilização da lipase, a conversão em **8** foi de 67%, e ao usar bucha vegetal, a conversão foi de 30%. Quando foi utilizado a lipase não imobilizada, a conversão ao éster foi de 23%. Contudo, este valor de conversão (23%) foi obtido com 96 h de reação. Sendo assim, a imobilização da lipase foi importante para obter bons resultados para a obtenção do acetato de citroneila.

A conversão em acetato de benzila (**9**) usando PS-SD livre e imobilizada em filme de amido de mandioca/PVA e em bucha vegetal pode ser observada na **Figura 22**.

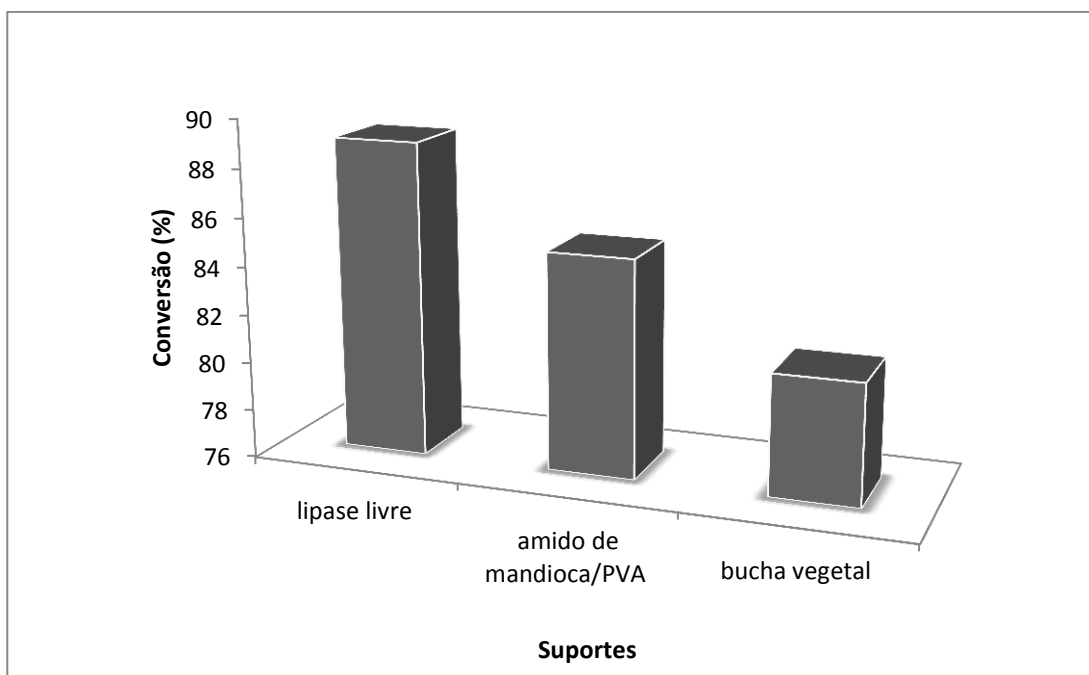


Figura 22: Conversão em acetato de benzila usando PS-SD livre e imobilizada em filme de amido de mandioca/PVA e bucha vegetal. [Condições reacionais: hexano (25 mL); 25 °C; 24 h; 30 mg PS-SD; acetato de vinila (5 mmol); álcool benzílico (5 mmol); 0,8g amido/0,2g PVA/0,3g sorbitol; conversão determinada por RMN de ^1H .]

Observa-se na **Figura 22** que ao usar a lipase imobilizada em filme de amido de mandioca/PVA, a conversão em acetato de benzila foi de 85%. Ao usar bucha vegetal como suporte, obteve-se 76% de conversão em **9**. Quando a PS-SD foi utilizada não imobilizada (forma livre), a conversão ao éster foi de 89%. Apesar do maior valor de conversão ter sido obtido com a PS-SD livre, este método não é muito vantajoso, pois pode causar a desnaturação da enzima e não permite a reutilização do biocatalisador, aumentando os custos do processo.

A **Figura 23** mostra conversões em acetato de *n*-octila (**10**) ao usar PS-SD livre e imobilizada em bucha vegetal e em filme de amido de milho/dextrana.

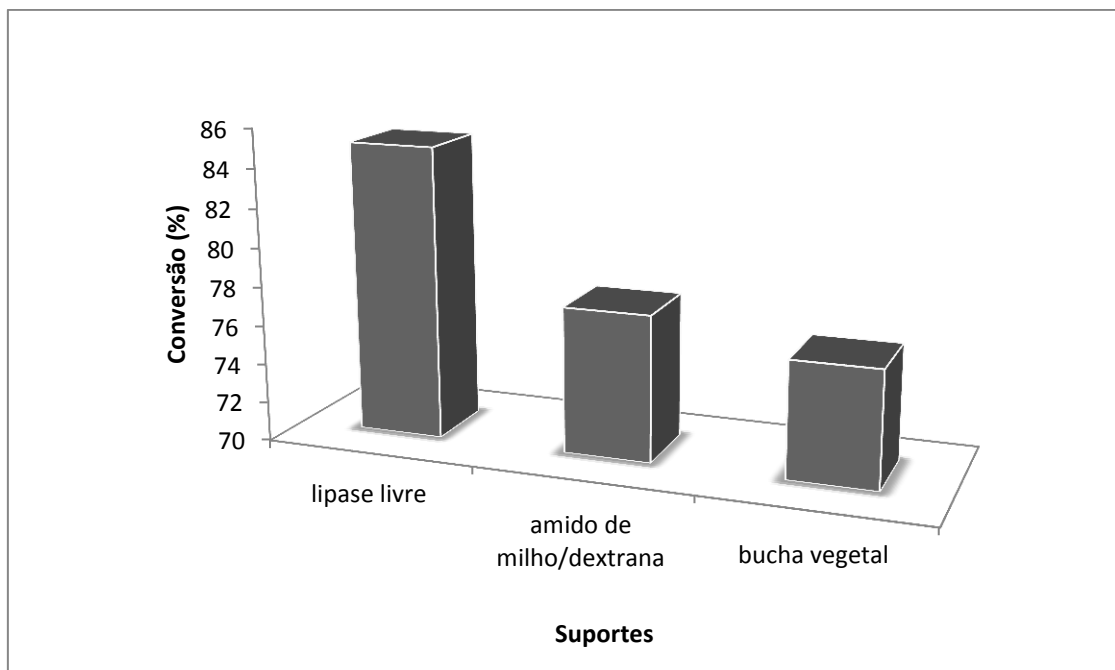


Figura 23: Conversão em acetato de *n*-octila usando PS-SD livre e imobilizada em filme de amido de milho/dextrana e em bucha vegetal. [Condições reacionais: hexano (25 mL); 25 °C; 24 h; 30 mg PS-SD; acetato de vinila (10 mmol); *n*-octanol (10 mmol); 0,8g amido/0,2g dextrana/0,3g sorbitol; conversão determinada por RMN de ¹H.]

Observa-se que a conversão em acetato de *n*-octila usando PS-SD imobilizada em filme de amido de milho/dextrana foi de 77,5% e usando a bucha vegetal foi de 76%. Ao usar a lipase livre, a conversão ao éster foi de 85%. Nota-se que foi obtido maior conversão em **10** ao usar a lipase livre do que quando utilizada imobilizada. Porém, ao usar a lipase não imobilizada, esta pode perder a atividade e pode não ser recuperada e reutilizada, tornando o processo mais oneroso.

Pode-se observar nas **Figuras 20-23** que quando a bucha vegetal foi usada como suporte na imobilização da PS-SD, as conversões aos ésteres foram próximas às obtidas quando foram usados como suportes os filmes de amido de inhame, de cará, de milho/dextrana, de mandioca/PVA e em filme de gelatina. Porém, estes resultados foram superiores ou próximos aos obtidos ao usar a PS-SD não imobilizada. Salienta-se que após a imobilização, a lipase fica protegida do meio orgânico, podendo ser reutilizada, sendo mais uma vantagem do método.

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, têm-se as seguintes conclusões:

- A bucha vegetal (BV) é um excelente suporte para imobilização de lipases.
- Foi possível imobilizar lipases de diferentes fontes e atividades em BV, e verificar a eficiência da imobilização na obtenção do octanoato de *n*-pentila (**6**).
- Análises de TGA e MEV mostraram a estabilidade do suporte e a eficiência do método de imobilização.
- O Método II e a lipase de *Rhizopus oryzae* (20mg-F-AP15) foram adequados na obtenção de **6**.
- Foi possível reutilizar o sistema BV/lipase F-AP15 por 5 ciclos na obtenção de **6** (14-80%).
- Foi verificada influência da temperatura de reação na obtenção de **6**, sendo escolhido 25 °C (93%).
- Os melhores solventes orgânicos na obtenção de **6** foram os apolares.
- O uso de misturas solvente orgânico/LIs foi importante e em alguns casos, verificou-se um aumento nas conversões ao éster **6**.
- Verificou-se a influência de diversos suportes na obtenção de ésteres de aroma.

Finalizando, salienta-se que a técnica de imobilização é uma ferramenta importante para melhorar e manter as propriedades e atividade do biocatalisador, e permitir a reutilização. A bucha vegetal é altamente benéfica, e além de desempenhar a função na imobilização de lipases, é um material barato, pode ser obtido de fontes renováveis, é biodegradável e, portanto economicamente viável e sem impactos para o meio ambiente.

7. REFERÊNCIAS

1. Yan H-D, Zhang Q, Wang Z. Biocatalytic synthesis of short-chain flavor esters with high substrate loading by a whole-cell lipase from *Aspergillus oryzae*. **Catal. Commun.** 2014;45:59–62.
2. Ozyilmaz G, Gezer E. Production of aroma esters by immobilized *Candida rugosa* and porcine pancreatic lipase into calcium alginate gel. **J. Mol. Catal. B Enzym.** 2010;64(3-4):140–5.
3. Cabral JMS, Aires-Barros MR, Gama M. **Engenharia Enzimática**. 1º ed. Lisboa: Lidel; 2003.
4. Solomons TW. **Química Orgânica**. 6º ed. Rio de Janeiro: LTC; 1996.
5. Campbell MK, Farrel SO. **Bioquímica**. São Paulo: Cengage Learning; 2007.
6. Petsko GA, Ringe D. **Proteins Structure and Function**. London: Science Press Ltda; 2004.
7. Nelson DL, Lehninger MM. **Principles of Biochemistry**. 3º ed. Worth Publishers; 2000.
8. Faber K. **Biotransformations in Organic Chemistry**. 6º ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2011.
9. Sharma R, Chisti Y, Banerjee UC. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnol Adv.** 2001;19(8):627–62.
10. Choi J-M, Han S-S, Kim H-S. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. **Biotechnol Adv.** 2015
11. Kapoor M, Gupta MN. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochem.** 2012;47(4):555–69.
12. Khan NR, Rathod VK. Enzyme catalyzed synthesis of cosmetic esters and its intensification: A review. **Process Biochem.** 2015;50(11):1793–806.

13. Shang C-Y, Li W-X, Zhang R-F. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on ZnO nanowires/macroporous silica composites for biocatalytic synthesis of phytosterol esters. **Mater Res Bull**. 2015;68:336–42.
14. Sheldon RA. Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. **Adv Synth Catal**. 2007;349(8-9):1289–307.
15. Mateo C, Palomo JM, Fernandez-Lorente G, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme Microb Technol**. 2007;40(6):1451–63.
16. Gonçalves RA., Oliveira AJ. **Biocatálise e Biotransformação: Fundamentos e Aplicações**. São Paulo: Schoba; 2012.
17. Milner SE, Maguire A R. Recent trends in whole cell and isolated enzymes in enantioselective synthesis. **ARKIVOC (i)**. 2012;321–82.
18. Cantone S, Ferrario V, Corici L, Ebert C, Fattor D, Spizzo P, et al. Efficient immobilisation of industrial biocatalysts: criteria and constraints for the selection of organic polymeric carriers and immobilisation methods. **Chem Soc Rev**. 2013;42(15):6262.
19. Ogbonna JC, Tomiyama S, Liu Y-C, Tanaka H. Efficient Production of Ethanol by cells immobilized in Loofa (*Luffa cylindrica*) Sponge. **J Ferment Bioeng**. 1997;84(3):271–4.
20. Partap S, Kumar A, Sharma NK, Jha KK. *Luffa cylindrica*: An important medicinal plant. **J Nat Prod Plant Resour**. 2012;1(2):127–34.
21. Silva MWK., Ranil RHG, Fonseka R. *Luffa cylindrica* (L.) M. Roemer (Sponge Gourd-Niyan wetakolu): An Emerging High Potential Underutilized Curcubit. **Trop Agric Res**. 2012;23(2):186–91.
22. Anbukarasi K, Kalaiselvam S. Study of effect of fibre volume and dimension on mechanical, thermal, and water absorption behaviour of luffa reinforced epoxy composites. **Mater Des**. 2015;66:321–30.

23. Tanobe VOA, Sydenstricker THD, Munaro M, Amico SC. A comprehensive characterization of chemically treated Brazilian sponge-gourds (*Luffa cylindrica*). **Polym Test**. 2005;24(4):474–82.
24. Shen J, Xie YM, Zhou S, Huang X, Ruan D. Water-responsive rapid recovery of natural cellular material. **J Mech Behav Biomed Mater**. 2014;34:283–93.
25. Jin Z, Ntwali J, Han S-Y, Zheng S-P, Lin Y. Production of flavor esters catalyzed by CALB-displaying *Pichia pastoris* whole-cells in a batch reactor. **J Biotechnol**. 2012;159(1-2):108–14.
26. McMurry J. **Química Orgânica**. 7^o ed. São Paulo: Cengage Learning; 2005.
27. Skoronki E, Bonetti TM, João JJ, Furigo Junior A. Estudo cinético da obtenção de ésteres utilizando enzima *lipozyme* TL IM como catalisador. **Ciênc Tecnol Aliment**. 2010;30(4):897–902.
28. Mai NL, Ahn K, Koo Y-M. Methods for recovery of ionic liquids—A review. **Process Biochem**. 2014;49(5):872–81.
29. Ameta G, Pathak AK, Ameta C, Ameta R, Punjabi PB. Sonochemical synthesis and characterization of imidazolium based ionic liquids: A green pathway. **J Mol Liq**. 2015;211:934–7.
30. Silva JC. **Preparação do acetato de 1-octila catalisada por lipases imobilizadas em filmes de amido de milho/dextrana**. [Florianópolis]: UFSC; 2013.
31. Hoffmann I. **Preparação do acetato e/ou alcanos de geranoila utilizando lipases imobilizadas em filmes de amido**. [Florianópolis]: UFSC; 2007.
32. Pinto MS. **Preparação do acetato de benzila catalisada por lipases imobilizadas em filmes de amido de mandioca/PVA**. [Florianópolis]: UFSC; 2013.
33. Henriques OR. **Imobilização de lipases em filme de gelatina: aplicação na síntese de ésteres de aroma**. [Florianópolis]: UFSC; 2008.

34. Morita C. **Manual de soluções, reagentes e solventes padronização, preparação, purificação, indicadores de segurança, descarte de produtos químicos.** São Paulo: Edgar Blucher; 2007.
35. Silverstein RM, Webster, R. X., Kiemle, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos.** Rio de Janeiro: LTC; 2006.
36. da Silva JMR, Nascimento M da G. Chemoenzymatic epoxidation of citronellol catalyzed by lipases. **Process Biochem.** 2012;47(3):517–22.
37. Yadav GD, Devendran S. Lipase catalyzed synthesis of cinnamyl acetate via transesterification in non-aqueous medium. **Process Biochem.** 2012;47(3):496–502.
38. Salihu A, Alam MZ. Solvent tolerant lipases: A review. **Process Biochem.** 2015;50(1):86–96.
39. Laane C. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. **Biotech Bioeng.** 1987;30:81–7.
40. Drauz K. **Enzyme catalysis in organic synthesis.** Weinheim: Wiley-VCH Verlag; 2012.
41. Nascimento M da G, da Silva JMR, da Silva JC, Alves MM. The use of organic solvents/ionic liquids mixtures in reactions catalyzed by lipase from *Burkholderia cepacia* immobilized in different supports. **J Mol Catal B Enzym.** 2015;112:1–8.